



**SAVONIA**

■ OPINNÄYTETYÖ - AMMATTIKORKEAKOULUTUTKINTO  
SOSIAALI-, TERVEYS- JA LIIKUNTA-ALA

# WESTERN BLOT- JA ELISA- MENETELMÄT MIKROBIO- LOGIAN LABORATORIOSSA

Posterit bioanalyttikko-opiskelijoille

TEKIJÄ/T: Emmi Janatuinen

Koulutusala Sosiaali-, terveys- ja liikunta-ala	
Koulutusohjelma Bioanalytiikan koulutusohjelma	
Työn tekijä(t) Emmi Janatuinen	
Työn nimi Western blot- ja ELISA-menetelmät mikrobiologian laboratoriossa. Posterit bioanalyttikko-opiskelijoille	
Päiväys 20.2.2015	Sivumäärä/Liitteet 55/7
Ohjaaja(t) Marko Björn	
Toimeksiantaja/Yhteistyökumppani(t) Savonia-ammattikorkeakoulu	
<p>Tiivistelmä</p> <p>Western blot- ja ELISA-menetelmiä käytetään mikrobiologian laboratoriossa infektioautien diagnostiikkaan. Western blot- ja ELISA-menetelmät perustuvat vasta-aineen ja antigeenin sitoutumiseen. Vasta-aineiden toiminta immunologisissa reaktioissa on sitoutua antigeeniin. Antigeenien ilmeneminen vaikuttaa immunologisenä reaktiona vasta-aineiden eli immunoglobuliinien lisääntyneeseen tuotantoon vieraan aineen esiintyessä elimistössä. Western blot- ja ELISA-menetelmissä käytetään vasta-aineeseen tai antigeeniin liitettyä entsyymileimaa, joka reagoi spesifisesti. Entsyymien tarkoitus on toimia indikaattorina analyysissä tapahtuneelle reaktiolle.</p> <p>Opinnäytetyöni tarkoitus oli selvittää Western blot- ja ELISA-menetelmien käyttöä mikrobiologiassa. Opinnäytetyöni tavoitteena oli koota yhteen tutkimustietoa Western blot- ja ELISA-menetelmien käytöstä mikrobiologiassa. Opinnäytetyö painottuu kirjallisuuskatsaukseen ja aiemman tutkimustiedon avulla selvitettiin ELISA- ja Western blot – menetelmien käyttöä mikrobiologiassa. Tuotin opinnäytetyön aineistosta posterin, joka on tarkoitus sijoittaa Savonia-ammattikorkeakoulun bioanalytiikan opetustiloihin.</p> <p>Opinnäytetyöni avulla hankin lisää tietoa, miten Western blot- ja ELISA-menetelmiä käytetään kliinisessä mikrobiologiassa. Tulevaisuudessa Savonia-ammattikorkeakoulun harjoitustunneilla on mahdollista tehdä harjoitus immunologiselle menetelmälle, missä opinnäytetyöni on luonut pohjaa uudelle harjoitustyölle.</p>	
Avainsanat Western blot, ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay, mikrobiologia, immunologia	

Field of Study Social Services, Health and Sports			
Degree Programme Degree Programme of Biomedical Laboratory Science			
Author(s) Emmi Janatuinen			
Title of Thesis Western blot and ELISA methods in clinical microbiology laboratory. Poster for biomedical laboratory science students			
Date	20.2.215	Pages/Appendices	55/7
Supervisor(s) Marko Björn			
Client Organisation /Partners Savonia University of Applied Sciences			
<p>Abstract</p> <p>Western blot and ELISA methods are used in a microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases. Western blot and ELISA methods are based on the binding of an antibody and an antigen. Antibody's role in immunological reactions is to bind to an antigen. When antigens appear in the body system antibodies are produced. Enzyme label that is conjugated to an antigen or antibody is used in Western blot and ELISA. The meaning of the enzyme is to indicate the reaction happened in the analysis.</p> <p>The meaning of the thesis was to find out how Western blot and ELISA methods are being used in microbiology. The aim of the thesis was to collect together research information from Western blot and ELISA methods in microbiology. The thesis focuses on a literature review and a poster was made from the information of the thesis. In the future it is possible that an immunological practice is done in the studies of immunology and my thesis could create a base for it.</p>			
Keywords Western blot, ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay, microbiology, immunology, method			

## SISÄLTÖ

1	JOHDANTO .....	6
2	MIKROBIOLOGIA.....	7
2.1	Bakteerit .....	7
2.2	Virukset.....	7
2.3	Sienet ja parasiitit .....	8
2.4	Kliininen mikrobiologia .....	9
3	IMMUNOLOGIA .....	10
3.1	Vasta-aine ja antigeeni.....	10
3.2	Monoklonaaliset vasta-aineet.....	12
3.3	Vasta-aineen entsyymileima .....	12
3.4	Immunologiset menetelmät ja niiden kehittyminen .....	13
4	WESTERN BLOT –MENETELMÄ .....	14
4.1	Western blot –menetelmän tausta .....	14
4.2	Elektroforeesin periaate.....	14
4.3	Western blot -menetelmä .....	14
5	ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY –MENETELMÄ.....	17
5.1	ELISA-menetelmän tausta .....	17
5.2	ELISA-menetelmä .....	17
6	HAKU KIRJALLISUUSKATSAUSTA VARTEN .....	20
6.1	Tiedon merkitys ja luotettavuus .....	20
6.2	Tiedon eettisyys.....	21
6.3	Kirjallisuuskatsaus.....	21
7	ELISA-MENETELMÄN KÄYTTÖ MIKROBIOLOGIASSA .....	23
7.1	Virusten tunnistaminen.....	23
7.2	Muiden mikrobien tunnistaminen .....	25
8	WESTERN BLOT –MENETELMÄN KÄYTTÖ MIKROBIOLOGIASSA.....	28
8.1	Virusten tunnistaminen.....	28
8.2	Muiden mikrobien tunnistaminen .....	30
9	KIRJALLISUUSKATSAUKSEN YHTEENVETO .....	33
9.1	Yhteenveto ELISA-menetelmien käytöstä mikrobiologiassa .....	33
9.2	Yhteenveto Western blot –menetelmien käytöstä mikrobiologiassa .....	34

10 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS.....	36
10.1 Opinnäytetyön luokittelu.....	36
10.2 Opinnäytetyöprosessi .....	36
10.3 Posterit .....	38
11 POHDINTA.....	40
11.1 Kirjallisuuskatsaus.....	40
11.2 Opinnäytetyön eettisyys .....	41
11.3 Oman oppimisen ja ammatillisen kehittymisen arviointi .....	41
LÄHTEET .....	43
LIITE 1: KIRJALLISUUSHAKU.....	49
Pubmed, Western blot .....	49
Science Direct, Western blot .....	50
Pubmed, ELISA .....	51
Science Direct, ELISA.....	53
LIITE 2: POSTERI .....	55

## 1 JOHDANTO

Western blot- ja ELISA-menetelmät perustuvat vasta-aineen ja antigeenin sitoutumiseen. Tämä kompleksi on elintärkeä osa ihmisen normaalia immuunipuolustusta torjuttaessa elimistölle vieraita aineita. Nykypäivänä vasta-aineiden käyttö ja immunologiset testit ovat yleisiä kliinisissä laboratorioissa ja vierianalytiikassa. (Carpenter 2011, 60-61.) Opinnäytetyöni aiheena on tehdä kirjallisuuskatsaus sekä posterin Western blot- ja ELISA- eli Enzyme-linked immunosorbent assay –menetelmistä mikrobiologian laboratoriossa. Opinnäytetyöni tarkoitus on selvittää Western blot- ja ELISA –menetelmien käyttöä mikrobiologiassa. Opinnäytetyön tavoitteena koota yhteen tutkimustietoa Western blot- ja ELISA-menetelmien käytöstä mikrobiologiassa. Tuotan opinnäytetyön aineistosta posterin, joka on tarkoitus sijoittaa Savonia-ammattikorkeakoulun bioanalytiikan opetustiloihin.

Savonia-ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelman immunologian opiskelukokonaisuutta tullaan muuttamaan: Teoriaopetuksen lisäksi kokonaisuuteen kuuluisivat myös harjoitustunnit, joissa tullaan perehtymään immunologisiin menetelmiin käytännössä. Savonia-ammattikorkeakoulun Terveystieteiden yksikkö on siirtynyt uusiin tiloihin Mikroakadulle, minne hankittiin myös uusi vertikaalinen elektroforeesilaitte. Tällä laitteella pystytään tekemään immunologista proteiinintunnistusta Western blot -menetelmällä. Tämä opinnäytetyö loisi pohjaa mahdolliselle toiselle opinnäytetyölle, jonka tarkoituksena olisi mahdollisesti tuottaa uusi harjoitustyöohje Western blot -menetelmästä koulun harjoitustunneille. Savonia ammattikorkeakoululla on ollut myös hankinnassa laite ELISA-menetelmälle. Opinnäytetyöni toimeksiantaja on Savonia ammattikorkeakoulu.

ELISA eli enzyme-linked immunosorbent assay on immunologinen menetelmä, jossa immobilisoituja vasta-aineita kiinnitetään kiinteään pintaan, esimerkiksi kuoppalevyyn. Antigeeni kiinnittyy kuoppalevyyn kiinnitettyyn vasta-aineeseen, minkä jälkeen testiin voidaan lisätä vielä vasta-aine, johon on leimattu entsyymi. Leimattu vasta-aine kiinnittyy spesifisesti antigeeniin. Kun testiin lisätään substraatti, se reagoi entsyymillä ja tuottaa mitattavan reaktion. (Thompson 2003, 246;256.) Western blot eli immunoblotaus on menetelmä, jossa proteiineja erotellaan denaturoivalla geelielektroforeesilla. Tämän jälkeen ajonäytteet siirretään ja kiinnitetään filtterille, johon lisätään antigeenille spesifistä vasta-ainetta. Vasta-aineiden spesifinen kiinnittyminen voidaan havaita visuaalisesti käyttämällä esimerkiksi kemiluminesenssileimaa. Kyseistä menetelmää käytetään useiden infektiivien tautien diagnostiikkaan, etenkin HIV-infektion varmistamiseen. (Carpenter 2011, 69-70.)

## 2 MIKROBIOLOGIA

Mikrobien lajimäärä on valtava ja niitä voi havaita kaikkialla luonnossa, niin maassa, vesissä, ilmassa, kasveissa, eläimissä kuin ihmisissä. Mikrobit ovat planeettamme varhaisimpia eliöitä, jotka ovat sopeutuneet moniin eri olotiloihin, kuten eri lämpötiloihin ja happamuusasteisiin. Ihmisen elimistössä viihtyvät mikrobit, normaalifloora ja tautia aiheuttavat mikrobit elävät parhaiten noin +35 – celsiusasteessa. Elimistömme mikrobeilla on paljon hyödyllisiä merkityksiä, esimerkiksi suoliston mikrobit ovat ihmiselle tärkeä osa toimivaa immuunisysteemiä ja tietyt mikrobit tuottavat elimistölle tarpeellisia vitamiineja, esimerkiksi K-vitamiinia. Bakteereita, sieniä ja parasitteja voidaan tarkastella valomikroskoopin avulla, viruksia elektronimikroskoopilla. Mikrobien kokoa ilmaistaessa käytetään yksikkönä nanometrejä (nm: 0,000 001 mm) tai mikrometrejä (µm: 0,001 mm). (Heikkilä 2005, 9-10.)

### 2.1 Bakteerit

Bakteerit ovat mikroskooppisen kokoisia yksisoluisia, suhteellisen yksinkertaisia organismeja. Bakteerit luokitellaan niin sanottuihin eubakteeri- ja arkkibakteerilinjoihin. Eubakteereilla tarkoitetaan varsinaisia bakteereita. Arkkibakteerilinjasta on haarautunut eukaryoottisolun eli aitotumaisen esiaste. Bakterisolusta löytyy DNA:ta, RNA:ta, proteiineja, lipidejä, hiilihydraatteja ja solukalvo, jota kutsutaan myös sytoplasmiseksi membraaniksi. Jäykkyyttä antava soluseinä esiintyy lähes jokaisessa bakteerissa. Bakteerit muodostavat kiinteällä ravintoalustalla silmin havaittavia pesäkkeitä jakaantuaan. Tautia aiheuttavat bakteerit omaavat piirteitä, jotka edistävät niiden taudinaiheuttamiskykyä. Yksi tärkeimmistä piirteistä on kyky tarttua, adheroitua kohteeseen, mikä tapahtuu useimmiten tarttumakarvojen eli fimbrioiden avulla. Bakteerit kykenevät siirtämään DNA:ta solulta toiselle paritumisen eli konjugaation avulla. DNA:n siirtämiseen on myös muita mekanismeja, kuten bakteriofaagien eli bakteerivirusten välitys ja transformaatio. Bakteereilla on myös ominaisuuksia selvityä epäedullisista oloista. Bakteerin lepomuoto, itiö, kykenee selviytymään hankalien olosuhteiden aikana, esimerkiksi kuivuudessa. Bakteeri kykenee keräämään ylimääräistä ravintoa niin kutsuttuihin inklusiokappaleisiin edullisten olosuhteiden vallitessa. (Vaara, Skurnik & Sarvas 2010.)

### 2.2 Virukset

Virukset ovat organismeja, joiden perintöaines on yksi- tai kaksisäikeistä DNA:ta tai RNA:ta. Nukleiinihappojen määrä vaihtelee suuresti eri virusten välillä. Isäntäsolun ulkopuolella virukset ovat metabolisesti inaktiivisia eli ne eivät kykene lisääntymään itsenäisesti. Virukset pystyvät lisääntymään elävissä soluissa hyödyntäen niiden synteesilaitteistoa ja muodostamaan infektiota aiheuttavia partikkeleita eri virioneja. Virionit sisältävät viruksen perintöaineen samalla siirtäen sen muihin soluihin. Paljon keskustelua herättää se, ovatko virukset eläviä: Geneettinen muuntelu selektiopaineessa ja jälkeläisenjättökyky vaikuttavat myönteisiltä ominaisuuksilta eliökuntaan kuuluviksi. Virukset ovat yksinkertaisia, pelkistettyjä loisia, jotka omaavat tarvittavat geenit sekä niitä ympäröivän, infektiokyvyn antavan suojaerroksen. Virionin ympärillä olevat proteiinit suojaavat nukleiinihappoja nukleaaesilta ja muilta vaurioittavilta ympäristötekijöiltä sekä välittävät viruksen tarttumisen elävään so-

luun. Vaipallisilla viruksilla on lipidikalvo virionin uloimpana kerroksena. Vaipan lipidit ovat isäntäsolun kalvorakenteita, joihin mahdollisesti liitetyt sokeriosat ovat peräisin isäntäsolun synteesikoneistosta. (Bamford, Hyypiä & Saksela 2010.)

Virus on rakenteeltaan pelkistynyt kokonaisuus, jonka tarkoitus on tunkeutua isäntäsoluun ja siirtää perimänsä, lisääntyä, vapautua isäntäsolusta ja kyetä seltivitytymään infektiokykyisenä haastavissakin olosuhteissa. Virus tunnistaa isäntäsolun pinnalta reseptorin, minkä jälkeen viruksen tunkeutuminen isäntäsoluun riippuu solun ominaisuuksista; onko kyseessä esimerkiksi eläinsolu tai bakteerisolun. Bakteerivirukset tunkeutuvat soluun yleensä jättäen kuoriosan solun pinnalle samalla siirtäen nukleiinihapponsa ja tiettyjä proteiineja solun sisään, kun eläinvirus siirtää sekä nukleiinihapponsa että proteiinihuoren eläinsolun sisään. Virusten proteiineilla on spesifiset tehtävät ja niiden kyky tuottaa proteiineja geneettisen kapasiteetin mukaan on yksinkertainen ja rajoittunut. (von Bonsdorff, Bamford & Vaheri 2007, 392-393.) Solun ulkopuolella virukset ovat elottomia, mutta tunkeutuessaan isäntäsoluun ja hyväksikäyttäessään solun toimintoja voi viruksella olla tuhoisia vaikutuksia isäntäsolulle. Viruksen eri rakenneosat, proteiinit ja genomi, syntyvät isäntäsolussa eri puolilla ja kerääntyvät yhteen infektiokykyiseksi partikkeliksi mahdollistaen uusien solujen infektoimisen. (Hyypiä & Ahola 2007, 404-405.)

### 2.3 Sienet ja parasiitit

Sienet ovat eukaryoottisia eli aiotumallisia eläviä organismeja, joiden luokittelu perustuu vielä nyky-päivänäkkin morfologiaan eikä biokemiallisiin tai metabolisiin eroihin. Kliinisesti merkittäviä sieniä ovat kaksi eri pääryhmää: hiivasienet ja rihmaisienet. Sienillä on eritasoisia taudinaiheuttamiskykyjä: Tiettyt sienet voivat aiheuttaa infektion terveelle henkilölle, kun tietyt sienet voivat infektoida henkilön, jonka yleistila ja vastustuskyky ovat heikentyneet. Nykyään sieni-infektioiden merkitys on kasvanut voimakkaasti, kun immuunistatukseltaan heikentyneiden potilaiden määrä on kasvanut. Tällaisissa tapauksissa sienet voivat aiheuttaa infektion esimerkiksi AIDS- tai elinsiirtopotilaalle. Sienet lisääntyvät joko suvullisesti tai suvuttomasti. (Kokki, Kuusela & Richardson 2003, 288-289.)

Parasiitit eli alkueliöt käyttävät hyväksi toista eliötä, jolle ne eivät tuota mitään hyötyä. Parasiiteiksi luetellaan lääketieteellisessä mikrobiologiassa ihmisessä tai eläimessä loisivat eliöt, jotka eivät ole viruksia, bakteereita tai sieniä. Parasiiteiksi luetellaan yksisoluiset alkueläimet tai sen tyyppiset eliöt, yksinkertaiset tai monimutkaisemmin rakentuvat madot, hyönteiset ja hämähäkkieläimet. Parasiiteista osa voi olla tautia aiheuttavia, patogeenisiä ja osa harmittomia kommensaaleja eli nonpatogeenisiä. Parasiittejä esiintyy ihmisen suolistossa, kudosten sisällä sekä iholla ja ne jaetaan neljään eri ryhmään: ihoparasiitteihin, suolistoparasiitteihin, veriparasiitteihin ja kudoksissa eläviin parasiitteihin. Parasiiteilla on lajille tyypillinen kiertokulku, ja varmistaakseen lisääntymisensä tulee niiden käyttää useita isäntiä tai väli-isäntiä. Useilla parasiiteilla on kiertokulussaan vähintään kaksi eri elämänmuotoa. Patogeeniselle parasiitille isäntäeliön puolustusjärjestelmän välttäminen on tärkeä osa sen taudinaiheuttamiskykyä. (Jokiranta & Meri 2010.)



## 2.4 Kliininen mikrobiologia

Kliininen mikrobiologia tutkii pieneliöiden eli mikrobien aiheuttamia infektioita ihmisillä. Kliinisessä mikrobiologiassa käsitellään taudinaiheuttajien lisäksi infektioautien syntyä, niiden diagnostiikkaa, hoitoa ja ehkäisymenetelmiä sekä elimistön puolustusmekanismeja. Kliininen mikrobiologia voidaan jakaa kliiniseen bakteriologiaan, kliiniseen virologiaan, kliiniseen parasitologiaan, kliiniseen mykologiaan ja kliiniseen immunologiaan. Tautia aiheuttavia, patologisia, mikrobeja ovat bakteerit, virukset, sienet ja parasiitit. Myös prionit muodostavat tautia aiheuttavan ryhmän, vaikka niitä ei luokitella perinteisesti mikrobeiksi. (Heikkilä 2005, 9.) Prionit eivät sisällä nykykäsityksen mukaan nukleiinihappoja, vaan ne muodostuvat joko kokonaan tai osittain solun tuottaman normaalin valkuaisaineen, prioniproteiinin muuntuneista muodoista (Paetau, Kalimo & Haltia 2010).

### 3 IMMUNOLOGIA

Immunologiset reaktiot ovat puolustusreaktioita elimistössä ulkoisia tekijöitä vastaan. Immuunisysteemi koostuu soluista ja molekyyleistä, jotka aiheuttavat immuunireaktion vieraan aineen ilmestyessä elimistöön. Fysiologinen merkitys immuunipuolustukselle on torjua infektoivia mikrobeja. Myös ei-infektoivat, tuntemattomat molekyylit, kuten proteiinit, polysakkaridit ja pienet kemikaalit voivat aiheuttaa immuunireaktion. Immuunireaktio voi syntyä myös elimistön omia soluja vastaan, jolloin puhutaan auto-immuunireaktiosta. Immuunisysteemi ja mikrobien torjunta koostuu kahdesta eri järjestelmästä: synnynnäisestä ja hankitusta immunitetistä. (Abbas, Lichtman & Pillai 2012, 1-2.)

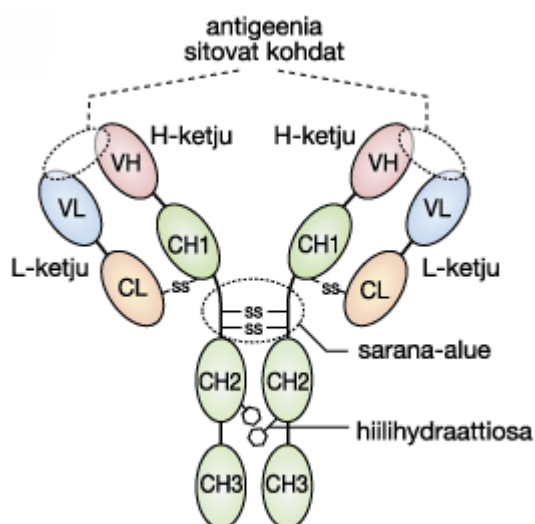
Immunologia lääketieteessä tarkoittaa yleisesti oppia elimistön puolustusjärjestelmistä, joiden avulla suojaudutaan infektioitaudeilta. Samat mekanismit ovat osana myös elimistön sisäisessä puhtaanapidossa ja homeostaattisen tasapainon ylläpidossa, mikä laajentaa käsitystä immunologiasta. Häiriöt immunologisissa järjestelmissä voivat johtaa tai altistaa ihmisen infektioitaudeille tai niin sanotuille immuunitaudeille. Immuunijärjestelmän ja mikrobien vuorovaikutusta tutkimalla on kehitetty lääketieteellisiä saavutuksia, kuten rokotukset. Immuunisysteemin toimintaa ymmärtämällä voidaan myös tutkia elimistön tilaa: Infektioautien diagnostiikassa hyödynnetään seerumin vasta-aineita tiettyjä mikrobeja vastaan. Vasta-aineiden määrällä, tyypillä ja sitoutumisvoimakkuudella voidaan saada tietoa infektion voimakkuudesta, ajankohdasta ja jo mahdollisesti sairastetusta infektiosta. (Meri 2011, 12-14.)

Synnynnäinen immunitetti torjuu mikrobeja niiden saapuessa ensimmäistä kertaa elimistöön. Synnynnäiseen immunitettiin liittyvät solu- ja biomolekyylimekanismit ovat elimistössä jo ennen infektoitumista ja tarkoituksena on nopean vasteen tuottaminen. Nämä mekanismit eivät tunnista spesifisesti vieraita molekyylejä, ja ne tuottavat saman vasteen aina tietyille mikrobin molekyylejä vastaaville aineille. Hankinnainen immunitetti stimuloituu altistuttaessa infektoivalle mikrobille tai molekyylille. Hankinnainen immunitetti kehittyy altistumisen myötä ja vaste sekä spesifisyys kasvavat mitä useammin kyseiselle molekyylille altistutaan. Hankinnaisella immunitetilla on kyky tunnistaa spesifisesti eri mikrobeja ja molekyylejä myös niiden ilmaantuessa uudestaan elimistöön. (Abbas, Lichtman ja Pillai 2012, 2-3.) Vasta-aineisiin perustuva immunitetti kuuluu hankinnaiseen immunitettiin. Ero humoraalisen ja solusitoisen immunitetin välillä on, leviävätkö immunologiset reaktiot elimistössä nestevirtauksen liukoisten molekyyliden vai erikoistuneiden immuunisolujen suoran toiminnan välityksellä. (Jokiranta & Seppälä 2011, 101.)

#### 3.1 Vasta-aine ja antigeeni

Antigeeni aiheuttaa immuunisysteemin aktivaation ja vasta-aineiden tuotannon kaikilla selkärangasella eläimillä ja ihmisillä. Antigeenin ilmaantuminen aiheuttaa immuunireaktion, joka on elimistön puolustuskoneiston tuntematon aine kohtaan. (Koivunen & Krogsfud 2006, 490.) Epitopiksi kutsutaan osaa antigeenissä, johon vasta-aine tai T-solureseptori sitoutuu (Jokiranta & Seppälä 2011, 14). Vasta-aineet eli immunoglobuliinit ovat albumiinin jälkeen verimassan toiseksi suurin proteiinifraktio (KUVA 1.). Vasta-aineita tuottavat B-lymfosyytit kypsyvät luuytimessä ja kypsällä B-

solulla on solukalvon pinnalla reseptoreita, jotka ovat erikoistuneet spesifiseen antigeeniin. Näitä kutsutaan B-solureseptoreiksi tai solukalvossa kiinni oleviksi vasta-aineiksi. Kehossamme on vapaasti eri elimistön nesteissä liikkuvia vasta-aineita sekä kalvon läpäiseviä, polypeptidiketjulla kiinnittyneitä vasta-aineita. Vasta-aineen perusrakenne koostuu Y-kirjaimen muotoisesta rakenteesta; proteiinirungosta ja hiilihydraattiosasta. Rungossa on kaksi identtistä H-polypeptidiketjua eli raskasketjua (heavy chain) ja kaksi identtistä L-polypeptidiketjua eli kevytketjua (light chain). (Jokiranta & Seppälä 2011,103.)



KUVA 1. ( Jokiranta & Seppälä 2011, 104.) Kuvassa IgG-luokan vasta-aine.

Immunoglobuliinimolekyyli kykenee tarttumaan antigeeniin vasta-aineen HL-ketjuparien mukaan, yhtä HL-ketjuparia kohden vasta-aine voi kiinnittyä yhteen antigeeniin. Täten IgG-luokan vasta-aineella on kaksi kohtaa, joilla se voi kiinnittyä samanlaiseen antigeeniin. H- ja L-ketjujen rakenteellisia, soikeita perusyksiköitä kutsutaan immunoglobuliinidomeeneiksi ja yleensä H-ketju sisältää neljä ja L-ketju kaksi domeenia. H-ketjut ovat kiinnittyneet kahdella tai useammalla kysteiiniaminohappojen muodostamalla rikkisillalla (S-S) sekä muilla sidoksilla. L-ketjut kiinnittyvät H-ketjuihin epäkovalenteilla sidoksilla ja yleensä yhdellä rikkisillalla. Sarana-alue on taipuisa osa, joka mahdollistaa kahden antigeenin sitoutumisen samaan vasta-aineeseen, vaikka antigeenit sijaitsisivat jopa vierekkäississä soluissa. ( Jokiranta & Seppälä 2011, 102-105.)

Vasta-aineiden toiminta immunologisissa reaktioissa on sitoutua antigeeniin. Antigeenien ilmeneminen vaikuttaa immunologisenä reaktiona vasta-aineiden eli immunoglobuliinien lisääntyneeseen tuotantoon vieraan aineen esiintyessä elimistössä. Vasta-aineet ovat immunoglobuliiniluokka, jotka jakavat yhtenevän rakenteellisen muodon ja toiminnalliset periaatteet. Vasta-aineiden toiminta voidaan jakaa niiden sitoutumiskyvyn mukaan niin antigeeniin kuin immuunipuolustukseen erikoistuneisiin soluihin tai proteiineihin. (Koivunen & Krogsfud 2006, 490-497.) Vasta-aine ja antigeeni kiinnittyvät spesifisesti, ja tämän sitoutumisen voimaa kutsutaan affiniteetiksi. Vasta-aineita on kuitenkin erityyppisiä ja sen myötä vasta-aineen ja antigeenin sitoutumiskohtia voi olla useita, kuten IgG:llä kaksi ja IgM:llä kymmenen. Aviditeetiksi kutsutaan siis vasta-aineen ja antigeenin sitoutumisen kokonaisvoimaa, kun affiniteetti vastaa yhden sitoutumiskohtan voimaa. (Carpenter 2011, 61.)

Vasta-ainevälitteinen immuniteetti kuuluu humoraaliseen immuniteettiin, jolloin immuunijärjestelmät leviävät elimistössä solunulkoisten nestefaasien mukana. Humoraaliseen immuniteettiin kuuluu myös komplementtijärjestelmä, jolla on suoraan mikrobeihin kohdistuvia, tuhoavia vaikutuksia. Immunglobuliinit (Ig) vastaavat vasta-ainevälitteisestä immuniteetistä ja ne jaotellaan eri luokkiin ja niiden alaluokkiin. Immunglobuliiniluokat ovat IgG, IgA, IgM, IgD ja IgE. (Jokiranta & Seppälä 2011, 101,112.)

### 3.2 Monoklonaaliset vasta-aineet

Monoklonaalisilla vasta-aineilla on tärkeä merkitys käytännön työskentelyssä laboratorioissa ja tutkimustyössä. Niiden avulla pystytään tunnistamaan solutyyppjä, diagnosoimaan tauteja immunologisten menetelmien avulla ja löytämään kasvaimia kuvantamismenetelmillä käyttäen leimattuja vasta-aineita merkkiaineina. Monoklonaalisia vasta-aineita käytetään myös terapiamuotona muun muassa autoimmuunisairauksiin, rinta- ja paksusuolen syöpään sekä Chronin tautiin. Monoklonaalisia vasta-aineita tuotetaan haluttua vasta-ainetta tuottavista B- eli plasmakloneista ja myeloomakloneista, jotka ovat plasmakloneiden kasvainsoluja ja pystyvät jakaantumaan loputtomasti. B-klorit, jotka tuottavat vasta-aineita, immunisoidaan tietyllä antigeenillä, jolloin ne alkavat tuottamaan spesifistä vasta-ainetta. Menetelmään käytetään yleensä hiiren B-kloria, jotka on immunisoitu ja sitten kerätty hiirestä. Myeloomakloneiden kyky tuottaa vasta-aineita on estetty, jolloin lopputuloksena syntyy vain haluttua vasta-ainetta. Myeloomaklorit ja hiirestä kerätyt B-klorit yhdistetään fuusiossa, jolloin syntyy hybridoomia. Kloneja kasvatetaan ympäristössä, jossa hiiren klorit ja B-klorit eivät pysty selviytymään. Vain hybridoomaklorit jakautuvat ja tuottavat lisää haluttua vasta-ainetta. (Abbas, Lichtman & Pillai 2012, 97-98.)

### 3.3 Vasta-aineen entsyymileima

Entsyymit kiihdyttävät elimistössämme valikoivasti biokemiallisia reaktioita ja ne katalysoivat useita eri reaktiotyyppjä. Entsyymien katalysoidessa, se muodostaa yleensä yhdistymän substraatin kanssa. Substraatti on molekyyli, johon entsyymien toiminta kohdistuu. Substraatin ja entsyymien reagoimassa syntyy myös kemiallinen muutos. Entsyymit koostuvat aminohapoista ja yleensä katalyysein onnistumiseksi tulee entsyymiin liittää kofaktori, joka lisää entsyymien katalyysimahdollisuuksia. Kofaktoreita ovat metalli-ionit ja orgaaniset molekyylit, joita kutsutaan myös koentyyimeiksi. (Heino & Vuento 2010, 66-67.)

Immunologisissa menetelmissä voidaan käyttää hyväksi eri leimoja vasta-aineissa tai antigeeneissa tunnistettaessa haluttu molekyyli. Eri leimoja ovat entsyymit, fluoresenssi- tai kemiluminesenssimolekyylit ja radioaktiiviset yhdisteet. Leimalla tulee olla tiettyjä ominaisuuksia, jotta se on käyttökelpoinen immunologisenä reagenssina: Leiman tulee reagoida spesifisesti ja leiman aktiivisuuden ei tule heikentyä vasta-aineeseen tai antigeeniin konjugoituna. Entsyymileimoja ei tulisi olla analyysissä liian korkeassa konsentraatiossa, sillä se haittaa analyysin mittaamisvaihetta. Yleisimpiä entsyymejä, joita käytetään leimoina, ovat piparjuuriperoksidaasi, alkalinen fosfataasi, glukooksidaasi ja  $\beta$ -

galaktosidaasi. (Feldkamp 2003, 238-239.) Entsyymien tarkoitus on toimia indikaattorina, jolla todetaan, että analyysissä on tapahtunut reaktio, yleensä värireaktio (Hohnadel 2003, 1060).

### 3.4 Immunologiset menetelmät ja niiden kehittyminen

Immunologisia menetelmiä käytetään mikrobiologian laboratorioissa infektiivien tautien diagnostiikassa ja viljelytulosten varmistamisessa. Menetelmät perustuvat vasta-aineisiin, joita käytetään analyttisinä reagensseina. Immunologiset menetelmät ovat nykypäivänä spesifisiä, sensitiivisiä ja suhteellisen halpoja kokeita. Erityinen spesifisyys vasta-aineen ja antigeenin sitoutumisen välillä on johtanut immunologisten menetelmien siirtymisen kliinisistä laboratorioista myös vierianalytiikkaan ja laboratorioiden ulkopuoliseen testaukseen. (Carpenter 2011, 60.)

Immunologisten menetelmien laadukkuutta ja luotettavuutta kuvaavat kaksi termiä, sensitiivisyys ja spesifisyys. Sensitiivisyys ilmoittaa määrän yksilöitä, joilla on todettu tauti halutulla menetelmällä. Sensitiivisyys ilmoittaa halutulla menetelmällä todetut niin kutsutut oikeat positiiviset. Erittäin sensitiivisellä menetelmällä tai testillä pystytään havaitsemaan valtaosa sairastuneista yksilöistä ja väärien negatiivisten osuus tuloksista on pieni. Spesifisyys ilmoittaa yksilöiden määrän, jotka on todettu negatiivisiksi halutulla menetelmällä eli se ilmoittaa niin kutsutut oikeat negatiiviset tulokset. Spesifisellä menetelmällä pystytään määrittämään valtaosa terveistä yksilöistä, eli negatiivisista tuloksista, ja tällöin väärien positiivisten tulosten osuus on pieni. (Carpenter 2011, 61.)

Yksi tapa jaotella immunologisia menetelmiä on jako heterogeenisiin ja homogeenisiin immunologisiin menetelmiin. Heterogeenisissä menetelmissä sitoutuneet kompleksit tulee erottaa sitoutumattomasta materiaalista. Homogeenisessä menetelmässä ei vaadita tätä erotteluvaihetta. Heterogeenisten menetelmien immunologiset reaktiot tapahtuvat tiettyyn pintaan kiinnitettynä (solid phase) ja homogeeniset reaktiot tapahtuvat ”vapaasti” (free-solution assay). Kuitenkin, kaikki menetelmät eivät aina täydellisesti vastaa jakoa heterogeenisiin ja homogeenisiin reaktioihin. Immunologiset menetelmät voidaan jakaa myös kolmella tavalla; Ilman leimaa suoritettavat, reagenssia rajattomasti ja reagenssia rajoitetusti käyttävät menetelmät. (Carpenter 2011, 60-61.)

## 4 WESTERN BLOT –MENETELMÄ

### 4.1 Western blot –menetelmän tausta

Western blot –menetelmää kutsutaan myös proteiinien blottaukseksi tai immunoblottaukseksi ja menetelmä on todettu hyväksi tutkittaessa proteiineja. Menetelmä on kehittynyt Southern blotting – ja Northern blotting –menetelmistä, joiden avulla erotellaan geielektroforeesissa DNA:ta ja RNA:ta. Southern Blotting –menetelmässä tietyn pituiset DNA-fragmentit erotetaan sekvenssin perusteella muusta DNA:sta, Northern blotting –tekniikalla havaitaan RNA:ta ja sen määrää. Vuonna 1979 Towbin kykeni erottamaan proteiineja elektroforeesin avulla käyttämällä polyakryyliamidi-urea geeliä ja siirtämällä proteiinit nitroselluloosakalvolle. Vuonna 1981 Burnetten myötä alkoi natriumdodekyylisulfaatti–polyakryyliamidigeelin käyttö ja menetelmää alettiin kutsua Western blotiksi. Menetelmässä erotellaan proteiineja tai denaturoituja proteiineja geielektroforeesin avulla ja proteiinit siirretään erilliselle kalvolle, missä ne tunnistetaan proteiineille spesifisillä vasta-aineilla. (Jensen 2012.)

### 4.2 Elektroforeesin periaate

Elektroforeesi perustuu sähkövirtaan, jonka avulla voidaan erottaa toisistaan yhdisteitä. Positiivisesti varautuneet yhdisteet liikkuvat negatiivisesti varautuneelle elektrodille eli katodille ja negatiivisesti varautuneet yhdisteet anodille eli positiivisesti varautuneelle elektrodille. Yhdisteiden liikkumiseen sähkökentässä vaikuttavat varauksen lisäksi myös yhdisteen koko sekä väliaineen ominaisuudet. Yleisesti elektroforeesilaitteisto koostuu jännitelähteestä (0-300 V, 0-250 mA), puskurikammioista, väliainetasosta, turvakannesta, näytteen annostelijasta ja värjäysyksiköstä. Elektroforeesiajon jälkeen ajonäytteet värjätään, minkä jälkeen niitä voidaan tarkastella silmämääräisesti. Ajolevyt voidaan myös kiinnittää ja tulkita densitometrillä näkyvän valon aallonpituuksilla, UV-valolla tai kvantitatiivista tulosta haluttaessa yhdisteiden lähettämän fluoresenssin mittauksella. Isoelektrisen fokuksinnin avulla yhdisteitä voidaan erotella ajossa pH-gradientin avulla, jolloin yhdisteet liikkuvat ajossa pisteeseen, jolloin yhdisteen varaus on nolla. Tätä pistettä kutsutaan isoelektriseksi pisteeksi. Elektroforeesin väliaineena on käytetty selluloosa-asetaattikalvoa, mutta agarosigeeli on korvannut valtaosan selluloosa-asetaattikalvon käyttökohteista. Elektroforeesimenetelmän uusin tekniikka on kapillaarielektroforeesi, jossa yhdisteitä erotellaan korkeajännitteen avulla. (Penttilä 2003, 111.)

### 4.3 Western blot -menetelmä

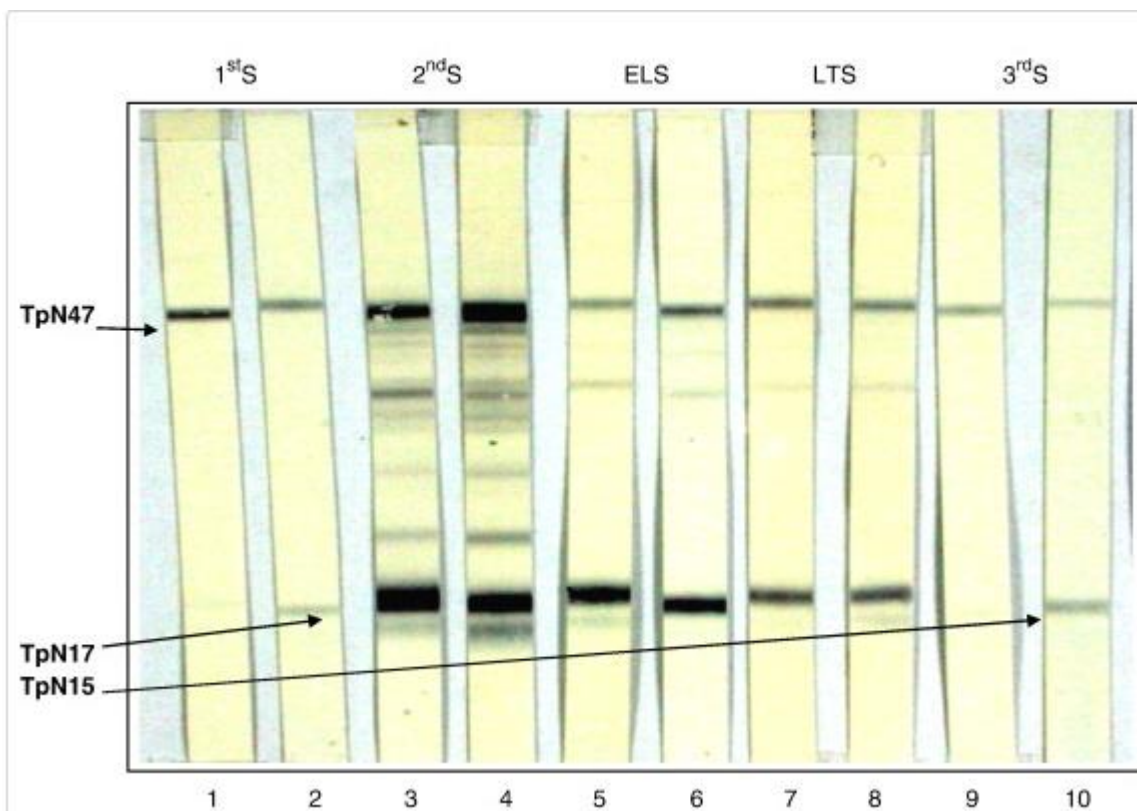
Näytteen valmistelussa Western blot –menetelmää varten haluttu kudokseksi tai halutut solut tulee jäädyttää mahdollisimman nopeasti tai käsitellä välittömästi soluja hajottavilla lysis-menetelmillä, jotta proteaasien aiheuttama proteiinien hajoaminen vältettäisiin mahdollisimman hyvin. Kudosten ja solujen valmistelu menetelmää varten voidaan suorittaa kylmässä lämpötilassa, jolloin pyritään estämään proteiinien denaturoituminen ja heikkeneminen. Myös suuret lämpötilojen vaihtelut näytteen valmistelun aikana voi vaikuttaa proteiinien laatuun. Solujen hajottamiseen ja proteiinien muuntamiseen vesiliukoiseksi on monia detergentejä, suoloja ja buffereita. Eri liuokset, bufferit, voidaan valita halutun proteiinin mukaan. Proteiinien hajoamisen välttämiseksi bufferiin voidaan lisätä myös inhibiittorit proteaaseja ja fosfataaseja vastaan, joita voi vapautua solujen hajoamisen aikana. Solujen

hajottamiseen käytettävien liuosten tulee säilyttää proteiinien tunnistamiseen vaadittavat rakenteet, jotta Western blot-menetelmä toimisi. (Jensen 2012.)

Ennen geelielektroforeesiajooa tulee määrittää näytteiden proteiinipitoisuus eli konsentraatio. Kokonaisproteiinin määrä saadaan mitattua spektrofotometrillä 280 nm aallonpituudella, kun bufferi ei sisällä mitään absorboivaa materiaalia. Ajoa varten näytteiden lisäksi geeliin tulisi lisätä ensimmäiseksi näyte, joka määrittää molekuläärisen painon proteiineille ja myös kontrolli, jonka konsentraatio ja molekyylipaino tunnetaan. Proteiinien erottelu tapahtuu geelielektroforeesissa isoelektrisen pisteen, molekulaarisen painon, sähköisen varauksen avulla tai näiden yhdistelmänä. Kuitenkin yleisin tapa polyakryyliamidigeelielektroforeesissa on käyttää näytteitä, joihin on lisätty SDS:ää eli natriumdodekyyliulfaattia, joka on voimakkaasti anioninen eli negatiivisesti varautunut detergentti. SDS:n lisäys saa eri tavoin varautuneet proteiinit denaturoitumaan ja saamaan negatiivisen varauksen. Tämä mahdollistaa molekyylin liikkumisen sähkökentässä molekyylipainonsa mukaan. Sähkökentässä molekyylit liikkuvat eri nopeuksin, mikä näkyy erikokoisina raitoina geelissä. Kaksisuuntaisessa geelielektroforeesissa proteiinit erotellaan ensin isoelektrisen pisteen ja toisen kerran molekyylipainon mukaan. Kun halutaan tutkia ja tunnistaa proteiinikomplekseja siirron jälkeiseltä kalvolta, tulee käyttää ei-denaturoivia materiaaleja ja geelejä. Kuitenkin tällaisten näytteiden tulosten tulkitseminen on vaikeampaa, sillä proteiinikompleksit eivät pysty liikkumaan polyakryyliamidigeelissä samoin kuin denaturoituneet, yksittäiset proteiinit. (Jensen 2012.)

Geelielektroforeesiajon jälkeen proteiinit voidaan siirtää geeliltä erilliselle kalvolle, joka voi olla nitroselluloosa-, polyvinylidifluoridikalvo, aktivoitu paperi tai nylon. Yleisin käytetty kalvo Western blot –menetelmässä on nitroselluloosa ja yleisimmin proteiinit siirretään kalvolle sähkökentän avulla. Sähkökenttä siirtää proteiinit geeliltä kalvolle nopeasti ja tehokkaasti. Jotta vasta-aineiden kiinnittyminen ei-haluttuihin kohtiin estettäisiin, kalvoa pidetään laimeassa proteiiniliuoksessa, joka sisältää esimerkiksi naudan albumiinia tai vähärasvaista maitoa. Liuoksen tarkoituksena on estää vasta-aineiden sitoutuminen väärin kohtiin, jolloin tuloksista tulee luotettavampia ja vääriltä positiivisilta tuloksilta vältetään. Vasta-aineiden lisäys tapahtuu yleensä kahdessa vaiheessa. Ensin lisätään primaari vasta-aine, inkuboinnin jälkeen kalvo pestään ja käsitellään laimeassa proteiiniliuoksessa. Tämän jälkeen toinen, sekundaarinen vasta-aine lisätään, inkuboidaan ja pestään. (Jensen 2012.)

Vasta-aineet eli koettimet, jotka ovat sitoutuneet haluttuihin proteiineihin, täytyy erottaa kalvolta. Erilaisia tunnistusmenetelmiä ovat muun muassa kolorimetrinen, radioaktiivinen, fluoresenssinen ja kemiluminesenssinen menetelmä, jota käytetään eniten Western blot –menetelmässä (KUVA 2.). Tehostetussa kemiluminesenssi-menetelmässä primaari vasta-aine sitoutuu proteiiniin ja sekundaari vasta-aine, johon on yleensä liitetty piparjuuriperoksidaasi aiheuttaa kemiluminesenssin reaktion, jonka voimakkuutta voidaan mitata yhdellä ilmaisimella. (Jensen 2012.)



KUVA 2. (Antunes de Lemos, Belém, Santos & Ferreira 2007.) Kuvassa *Treponema pallidum* –bakteerin aiheuttaman syfilis-infektion taudin eri kliiniset vaiheet: 1<sup>st</sup>: Primaari syfilis, 2<sup>nd</sup>: sekundäärinen syfilis, ELS: aikaisen vaiheen latentti syfilis, LTS: myöhäisen vaiheen latenssi syfilis, 3<sup>rd</sup>: tertiaarinen syfilis.



## 5 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY –MENETELMÄ

### 5.1 ELISA-menetelmän tausta

Eri tutkimusryhmät ovat samaan aikaan kehittäneet ELISA- (enzyme-linked immunosorbent assay) ja EIA-menetelmiä (enzyme immunoassay). Perter Perlmann ja Eva Engvall kehittivät Tukholman yliopistossa ELISA:aa ja Anton Schuurs ja Bauke van Weemen EIA:aa Alankomaissa. Kummatkin menetelmistä pohjautuvat immunologiseen analyysiin, jossa entsyymi toimii leimana radioaktiivisen leiman sijaan. ELISA:n ja EIA:n kehittymistä pohjustaa RIA:n (radio immunoassay) käyttö, jossa koettimena käytettiin radioaktiivista leimaa. RIA kuvattiin ensimmäisen kerran 1960 Solomon Bersonin ja Rosalon Yalowin toimesta Veteran Administration –sairaalassa New Yorkissa. (Lequin 2005.) RIA:n avulla kyettiin tunnistamaan ennen tunnistamattomia analyyttejä, saavuttaen samalla parempi sensitiivisyys. Myös monoklonaalisten vasta-aineiden kehittäminen auttoi luomaan yhä spesifisempiä menetelmiä ja laajensi mahdollisten analyyttien määrää, joita immunologisilla menetelmillä voisi havaita. (Carpenter 2011, 60.)

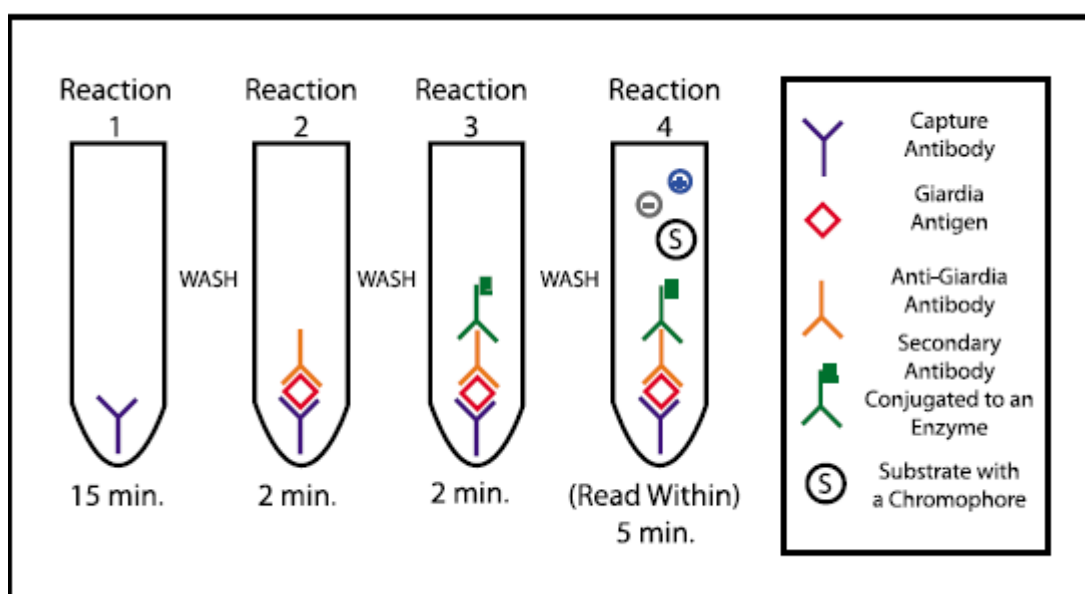
Engvall ja Perlmann julkaisivat ensimmäisen tutkimuksensa ELISA:sta vuonna 1971 ja kuvasivat siinä kanin IgG:n kvantitatiivisen määrittämisen alkalisen fosfataasin ollessa reaktiota mittaava leima. Samana vuonna van Weemen ja Schuurs julkaisivat tutkimuksensa EIA:sta, jossa määritettiin ihmisen goriongonadotropiinin konsentraatiota virtsassa. Tutkimuksessa leimana käytettiin piparjuuriperoksidaasi–entsyymiä yhdistettynä glutaraldehydiin. Nykypäivänä EIA ja ELISA ovat kehittyneet täysin automatioiduiksi menetelmiksi, jotka tulevat säilymään kliinissä laboratorioissa (Lequin 2005.)

### 5.2 ELISA-menetelmä

Puhuttaessa yleisesti immunologisista menetelmistä, useat termit tulevat esiin monissa eri yhteyksissä. ELISA eli enzyme-linked immunosorbent assay tulee ilmi usein, kun puhutaan EIA:sta eli enzyme immunoassay –menetelmästä. EIA kuvaa yleisesti immunologista analyysia (immunoassay), jossa käytetään entsyymileimaa. ELISA-menetelmää käytetään myös puhuttaessa entsyymileimaisista analyyseistä, mutta useimmiten ELISA:an viitataan, kun vasta-aine tai antigeeni on kiinnitetty kiinteään pintaan (solid phase). (Carpenter 2011, 60-61.)

Immunologisissa menetelmissä entsyymeillä leimatut vasta-aineet ovat tärkeässä roolissa, kun reaktiotuotetta mitataan. Vasta-aineeseen tai antigeeniin on liitetty entsyymileima, joka substraatin kanssa reagoidessaan tuottaa mitattavan reaktiotuotteen. Yleisimpänä mittaustapana on värireaktion muodostuminen, joka tapahtuu substraatin ja entsyymin reagoidessa keskenään. Tämä värireaktio voidaan mitata silmämääräisesti tai spektrofotometrillä. Värin muodostumisella voidaan määrittää analyysissä läsnä olevan analyysin määrää. Immunologisissa menetelmissä on suoria ja epäsuoria menetelmiä, joissa vasta-aineiden lisääminen tapahtuu eri järjestyksissä. Reaktiot voivat olla joko kilpailevia tai ei-kilpailevia. Kilpailevissa menetelmissä haluttu antigeeni potilasnäytteestä kilpailee samanlaisen, mutta entsyymileimatun antigeenin kanssa vasta-aineiden sitoutumispaikoista. (Carpenter 2011, 65-66.)

Yksi yleisimmistä ELISA-menetelmistä on niin kutsuttu sandwich-ELISA tai kaksoisvasta-ainetekniikkaan perustuva ELISA, jolloin tunnettu vasta-aine on kiinnitetty kiinteään alustaan, esimerkiksi kuoppalevyyn (KUVA 3.). Kyseiselle alustalle lisätään näyte, josta haluttu antigeeni kiinnittyy inkuboinnin aikana kiinteässä alustassa oleviin kiinnittyneisiin vasta-aineisiin. Antigeenin sitoututtua vasta-aineeseen suoritetaan pesu, jossa poistetaan kaikki sitoutumaton materiaali ja lisätään sekundaarinen, leimattu vasta-aine joka kiinnittyy antigeeniin. Toisen inkuboinnin jälkeen alustaan lisätään substraatti. Substraatin ja entsyymien reaktiossa syntyy värillinen loppureaktio. Toinen ELISA-menetelmä on kilpailevaan sitoutumiseen perustuva ELISA, jossa mitattava antigeeni kilpailee leimatun antigeenin kanssa samanaikaisesti vasta-aineeseen kiinnittymiseen. Vasta-aine on kiinnitetty kiinteään faasiin. (Carpenter 2011, 66; Halonen 2003, 90,95.)



KUVA 3. (Koivunen & Krogsfud 2006, 493.) Kuvassa giardiaasi-infektion tunnistamiseen kehitetty sandwich-ELISA –menetelmä (GiardEIA).

Kuvaan alla ELISA-menetelmän käyttöä tutkittaessa esimerkiksi rotavirusinfektiota ulostenäytteestä. Noin 100 µl/mg ulostetta suspensoidaan 1 ml bufferia ja sentrifugoinnin jälkeen kiinteät kappaleet pystytään poistamaan suspensiosta. Supernatanttia voidaan käyttää eri konsentraatioissa, ja se lisätään alustalle, esimerkiksi kuoppalevyyn, johon on jo valmiiksi kiinnitetty rotavirukselle spesifinen vasta-aine. Tämän jälkeen alusta voidaan sentrifugoida (2,500 rpm x 15 min), jolloin virus pystyy kiinnittymään spesifiseen vasta-aineeseen. Sentrifugoinnin jälkeen testiä inkuboidaan yksi tunti vasta-aineen ja antigeenin sitoutumisen varmistamiseksi +37°C hiilidioksidi-inkubaattorissa. Inkuboinnin jälkeen supernatantti poistetaan ja kuoppalevy pestään vähintään kaksi kertaa pesupuskurilla. Pesujen jälkeen pyritään estämään seuraavaksi lisättävien vasta-aineiden ei-haluttu sitoutuminen estopuskurilla (blocking buffer), joka sisältää esimerkiksi rasvatonta maitoa. Estopuskurin annetaan vaikuttaa kuoppalevyssä 45 minuuttia, minkä jälkeen supernatantti poistetaan ja suoritetaan pesu pesupuskurilla. Polyklonaalinen anti-rotavirus -vasta-aine, joka on liuotettu estopuskuriin, lisätään kuoppalevyyn primäärisenä vasta-aineena, ja sitä inkuboidaan tunnin ajan. Pesun jälkeen lisätään toinen, sekundäärinen vasta-aine kuoppalevyyn ja inkuboidaan tunnin ajan. Sekundäärinen vasta-

aine sitoutuu primääriin vasta-aineeseen. Sekundääriseen vasta-aineeseen on lisätty entsyymileima ja pesun jälkeen kuoppalevyyn lisätään substraatti. Substraatin ja entsyymileiman reagoidessa syntyy mitattava lopputuote, joka voidaan mitata esimerkiksi 450/620 nm reaktion mittaamiseen erikoistuneella lukijalla. (Adlhoch ym. 2011.)

## 6 HAKU KIRJALLISUUSKATSAUSTA VARTEN

Suoritin kirjallisuuskatsaukseeni hankitun materiaalin haun kahdesta eri hakukoneesta, Pubmedistä ja Science Directistä. Kirjallisuuskatsaukseeni käytin hakusanoina kyseisiä asiasanoja: Microbiology, Method, Western blotting, Enzyme-linked immunosorbent assay. Pubmedissä käytin Mesh-asiasanoja, jotka rajasivat aiheen hakua tarkemmin ja Science Directissä valitsin hakuni koskemaan alaa Immunology and Microbiology. Kirjallisuuskatsaukseen tuli yhteensä kaksikymmentäkolme artikkelia, joista 11 artikkelia liittyi Western blot- ja 12 artikkelia ELISA-menetelmään. Kirjallisuuskatsauksen hakutulokset löytyvät liitteenä opinnäytetyön lopusta.

Pubmed-hakukannan omistavat Yhdysvaltojen National Institutes of Health ja US National Library of Medicine. Pubmed-haussa käytin MeSH-asiasanoja (Medical Subject Headings), jotka ovat kontrolloituja termejä artikkeleiden hakuun Pubmedissä. (Pubmed.) Science Direct- hakukannan omistaa Elsevier-kustantamo, joka tarjoaa tieteellisiä artikkeleita monilta eri tieteen aloilta (Science Direct 2014). Rajoitin hakuni koskemaan immunologian ja mikrobiologian alaa, minkä myötä hakuihin tuli myös paljon tuloksia mikrobiologiaan liittymättömistä aiheista.

Alla oleva kirjallisuushaku on esimerkkinä tekemistäni hauista. Kyseinen haku on Pubmed-hakukannasta: "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay/methods"[Mesh] AND "Microbiology"[Mesh] AND ("2004/09/30"[PDat] : "2014/09/27"[PDat] AND "humans"[MeSH Terms]). Haulla sain 90 hakutulosta. Julkaisuväliksi valitsin kymmenen vuotta hakupäivästä (27.9.2014) ja haku rajoitettiin ihmisiin. Hakua rajoittavia filttäreitä jouduin käyttämään, sillä muuten hakutulosten määrä olisi ollut aivan liian suuri. Valitsin kahdeksan hakukohdetta kirjallisuuskatsaukseeni.

### 6.1 Tiedon merkitys ja luotettavuus

Tutkimustyö on syntynyt inhimillisestä tarpeesta ratkaista ongelmat mahdollisimman tehokkaasti. Uuden tiedon avulla pyritään ymmärtämään ratkaistavien ongelmien luonnetta ja löytämään uusia keinoja niiden ratkaisemiseen. Uutta tutkimustietoa syntyy jatkuvasti lisää, eikä tutkimustiedon merkitystä voi vähätellä. Tieteellinen tieto on nykypäivänä sulautunut yhteiskunnalliseen, kollektiiviseen tietovarantoon, minkä vuoksi yksittäisen kansalaisen saattaa olla vaikea tiedostaa tutkimustiedon olemassaoloa, sen syntyä ja historiaa. Muutostilanteissa hallinta edellyttää kehittyntä syvällistä näkemystä sekä perusteltuja näkökantoja muutosten suorittamiseen ja ongelmien ratkaisuun. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2004, 20-21.)

Tutkimustyölle, jota kutsutaan myös tieteelliseksi tutkimukseksi, on kehitetty vaatimuksia, normeja, joita voidaan käyttää myös tieteellisen ajattelutavan omaksumiseen. Ensimmäinen vaatimus on tiedon universalismi: yleispätevät kriteerit ohjaavat väitteen tieteellistä arvoa ja totuutta niin, etteivät esittäjän henkilökohtaiset ominaisuudet tai mielipiteet vaikuta tiedon luonteeseen. Toisena vaatimuksena on yhteisöllisyys, jolloin tieto on kansainvälisen yhteisön omaisuutta. Kolmannen vaatimuksen, puolueettomuuden, tulisi taata, että tieteellisen tiedon etsiminen ja esittäminen ovat riippumattomia tiedon esittäjän henkilökohtaisesta urasta tai arvovallasta. Neljäs vaatimus alistaa tiedon kriit-

tiseen tarkasteluun: Järjestelmällisen epäilyn periaatteen mukaan tutkimustieto tulee asettaa tiedeyhteisön julkiseen ja kriittiseen tarkasteluun. (Hirsjärvi ym. 2004, 23-24.)

## 6.2 Tiedon eettisyys

Etiikan tarkoitus on puolustaa tärkeinä pidettyjä arvoja, sitä mitä pidetään hyvänä ja moraalisesti oikeana tekona. Etiikkaa ei voi kutsua samalla tavalla velvoittavaksi kuin laki, etiikan ohjeet ovat suosituksen tapaisia. Jotta tutkimus olisi luotettava ja eettinen, tulisi tutkijan sitoutua yleisiin normeihin ja kannanottoihin, joiden avulla tutkimus saavuttaisi halutun tuloksen. Tutkimus- ja kehittämishanketoiminnalle on asetettu lainsäädännöllä rajoja, jotka suojaavat yksilöä ja yhteisön oikeuksia. Eettisten suositusten ja ohjeiden avulla voidaan lisätä tätä suojaa esimerkiksi arvoperustalla, jota erityisesti terveydenhuollossa tulisi noudattaa. (Heikkilä, Jokinen & Nurmela, 2008, 43.)

Nykyään tiedonhankintaan, tutkimukseen ja julkaisuun on yleisesti hyväksytyt ja yksimieliset tutkimuseettiset periaatteet. Kuitenkin tutkimustieto ja eettiset kysymykset ovat nykypäivänä herättäneet paljon ajatuksia. Tieteellinen tieto on ollut avainasemassa nykyisen hyvinvointivaltion muodostumisessa, minkä vuoksi se on myös saanut tunnustetun aseman. Tieteen ja yhteiskunnan kietoutuessa toisiinsa, nykypäivän hyvinvointiyhteiskunnan ongelmassa on kyseenalaistettu tieteellisestä tiedosta saatu hyöty. Myös kehitys tieteellis-teknisellä alalla on tuonut lisää epäkohtia ja maailmanlaajuiset ongelmat, kuten sodat, ympäristöongelmat ja globaali eriarvoisuus ovat luoneet pohdintaa, mikä on tieteen vastuu asioiden ratkaisussa. Nämä tekijät kuvaavat tieteen sosiaalieettistä vastuuta. (Hirsjärvi ym. 2004, 23-24.)

## 6.3 Kirjallisuuskatsaus

Kirjallisuuskatsaukset voidaan jakaa kolmeen eri perustyyppiin: kuvailevaan ja systemaattiseen kirjallisuuskatsaukseen sekä meta-analyysiin. Kuvaileva kirjallisuuskatsaus on yksi yleisimmin käytetty katsaustyyppi ja sitä voi kuvailla myös yleiskatsauksaukseksi, jolla ei ole tarkkoja sääntöjä. Aineistot ovat laajoja, niiden valintaa ei rajaa metodiset säännöt. Kuitenkin tutkittava ilmiö pystytään kuvaamaan laaja-alaisesti ja myös tarvittaessa luokittelemaan tutkittavaan ilmiöön liittyviä ominaisuuksia. Kuvaileva kirjallisuuskatsaus jaetaan narratiiviseen ja integroivaan kirjallisuuskatsaukseen. Narratiivinen yleiskatsaus tiivistää aiemmin tehtyjä tutkimuksia ja analyysin muoto on kuvaileva synteesi, jonka yhteenveto kehittyy johdonmukaiseksi ja ytimekkääksi kokonaisuudeksi. (Salminen 2011.)

Narratiivinen kirjallisuuskatsaus voidaan ymmärtää tavanomaisena kirjallisuuskatsaus-käsitteenä, jolloin katsauksen avulla voidaan kuvailla halutun ongelmatilanteen taustaa tai kehitystä, kuvailla teoreettista tai käsitteellistä taustaa tai yhdistellä eri tutkimusalueita. Narratiivinen kirjallisuuskatsaus on asiantuntijan tai asiantuntijaryhmän kokoamana katsaus tietyistä aihealueista. Kyseisen kirjallisuuskatsauksen avulla saadaan kokonaiskuva aiheesta, mutta tulee huomoida, että katsaus on tehty tiettyjen henkilöiden näkökulmasta. Narratiivisessa kirjallisuuskatsauksessa tutkimusten hakua, valintaa ja käsittelyprosessia ei välttämättä ole kuvattu tarkasti, minkä myötä katsauksen lukija ei voi arvioida kyseisiä asioita. Systemaattinen kirjallisuuskatsaus on kasvattanut huomiotaan näyttöön perustu-

van toiminnan myötä. Sen avulla voidaan löytää mahdollisesti tutkimustuloksia, jotka ovat korkealaatuisesti tutkittuja. Systemaattisessa kirjallisuuskatsauksessa korostuu spesifinen tarkoituksen ja tarkan tutkimuksen analysointi- ja syntetisointiprosessin valinta. Meta-analyysissä systemaattisen kirjallisuuskatsauksen tuloksia analysoidaan kvantitatiivin eli tilastollisin menetelmin. (Johansson 2007, 4-5.)

Kirjallisuuskatsauksen tulee keskittyä kirjallisuuteen, joka on tutkimuskysymysten kannalta olennaista. Aikakauslehtiartikkelit, tutkimusselosteet ja muut keskeiset julkaisut ovat mahdollisia kirjallisuuskatsauksen lähteitä ja kirjallisuuskatsauksen avulla pyritään selvittämään, mistä näkökulmista ja miten kyseistä asiaa on tutkittu aiemmin. Kirjallisuuskatsauksen avulla voidaan saada tietoa siitä, miten suunnitteilla olevat tutkimukset liittyvät aiempiin tutkimuksiin. Kirjallisuuskatsauksen tulkinnessa ja tulosten esittelyssä tutkijan tulee olla puolueeton, objektiivinen, ja ja rehellinen. Kirjallisuuskatsauksen laatimisessa on tärkeää muistaa oman työn tavoitteet ja tutkimusongelmat. (Hirsjärvi ym. 2004, 112-113.)

## 7 ELISA-MENETELMÄN KÄYTTÖ MIKROBIOLOGIASSA

### 7.1 Virusten tunnistaminen

Kahdella eri tavalla toimivaa, uutta ELISA-menetelmää on tutkittu H7-lintuinfluenssaviruksen tunnistamisessa. Menetelmän todettiin olevan erittäin sensitiivinen ja 100 % spesifinen H7-lintuinfluenssainfektion diagnostiikassa. Menetelmässä käytettiin kahta monoklonaalista vasta-ainetta, jotka tunnistavat rakenteellisesti H7-lintuinfluenssaviruksen kaksi neutralisoivaa epitoppia. Menetelmän sensitiivisyyttä testattiin ihmisperäisillä näytteillä ja spesifisyyttä kanoilla, hiirillä ja marsuilla, jotka infektoitiin keinotekoisesti H7-lintuinfluenssaviruksella. Kyseisessä tutkimusartikkelissa tutkittiin lintuinfluenssaviruksen antigeenin ja vasta-aineen tunnistamista kahdella eri ELISA-menetelmällä ja tarkoituksena tällä työllä on ollut kehittää luotettava ja nopea menetelmä lintuinfluenssadiagnostiikkaan. Verrattuna esimerkiksi real time PCR-menetelmään, ELISA-menetelmä on nopea, yksinkertainen ja kustannusvaikuttava. Tutkimuksella on ollut myös käyttötarkoitusta selvittäessä Kiinassa esiintyneen H7N9-influenssaepidemian selvitystä. (He, Prabakaran, Tan, Indira, Kumar & Kwan 2013.)

Italiassa tehdyssä tutkimuksessa on verrattu gastrointestinaalivirusten tunnistamiseen liittyviä kaupallisia ELISA-menetelmiä polymeraasiketjureaktioon eli PCR:ään. Myös immunokromatografista menetelmää verrattiin PCR:ään. Vuonna 2011 huhtikuun ja syyskuun välisenä aikana saapuneista potilaista, joilla oli maha-suolitulehdus (n:253), kerättiin 253 ulostenäytettä. Näytteistä tutkittiin virusinfektiota rotaviruksesta (RV), noroviruksesta (NoV), astroviruksesta (HAstV) ja adenoviruksesta (HAdV) kaupallisilla ELISA-kiteillä. Näytteistä tutkittiin myös real-time PCR:llä tai real-time reverse transcription PCR:llä samat virukset kuin ELISA-kitellä. Kaikkien ELISA-menetelmien spesifisyys verrattuna PCR:ään oli korkea (97,7% - 100%) mutta sensitiivisyys vaihteli paljon eri ELISA-kittien välillä (28,6% - 100%). Astroviruksen tunnistukseen liittyvä kitti oli sensitiivisyydeltään 100%, mutta 253 näytteestä vain kaksi oli positiivisia. Tämä tutkimus osoitti, että ELISA-kitit astroviruksen ja rotaviruksen tunnistukseen voivat olla luotettavia, nopeita ja helppoja diagnosoinnin välineitä. ELISA-kitti noroviruksen tunnistamiseen oli matala sensitiivisyydeltään, mutta sitä voisi käyttää mahdollisesti seulontaan epidemia-aikaan. (Rovida, Campanini, Sarasini, Adzasehoun, Piralla & Baldani 2013.)

Pekingissä, mikrobiologian ja epidemiologian insituutissa tehdyssä tutkimuksessa on kehitetty ELISA-menetelmä (array), jolla pystyttäisiin tunnistamaan samanaikaisesti viisi aivotulehdukseen linkitettyä viraalista patogeenia. Menetelmässä käytettiin seitsemää eri monoklonaalista vasta-ainetta tunnistamaan aivotulehdukseen liittyviä viruksia. Tutkimuksissa selvisi menetelmän olevan helppo käyttää, sensitiivinen, spesifinen ja sitä voisi suositella kliiniseen käyttöön. Verrattuna tavanomaisiin ELISA-menetelmiin, tutkittu menetelmä osoitti samanlaista spesifisyyttä mutta korkeampaa sensitiivisyyttä. Menetelmä validoitiin tutkimuksessa. (Kang ym. 2012.)

Jatkuvat korkean riskin papilloomavirus-infektiot (HPV) ovat yksi päätekijöistä kohdunkaulan syövän synnyssä. Onkoproteiinia, HPV E7, on esitetty mahdolliseksi markkeriksi tuumoriekspressiossa ja täs-

sä tutkimuksessa on kehitetty uutta menetelmää HPV 18 E7 –onkoproteiinin tunnistamiseksi kohdunkaulanäytteestä. Sandwich-ELISA-menetelmä kehitettiin tunnistamaan spesifistä HPV 18 E7 –onkogeneeniä ja menetelmä validoitiin käyttämällä rekombinantteja E7-proteiineja eri HPV tyypeistä ja E7-positiivisista kohdunkaulansyöpäsoluista. Tällä käyttökelpoisuustutkimuksella pyrittiin esittämään ensimmäistä kertaa HPV18 E7-onkoproteiinin tunnistamista kohdunkaulan näytteestä. Tutkimuksessa kuvattiin myös pieni kelpoisuustutkimus, jolla pyrittiin edistämään menetelmän mahdollista käyttöä tulevaisuudessa kliinisessä käytössä. 272 kohdunkaulanäytettä kerättiin ja tyypitettiin DNA-määrityksellä. 16 näytettä oli HPV18-positiivisia, joista kahta ei voitu käyttää huonon säilyttämisen vuoksi. Jäljelle jääneistä 14 HPV18-positiivisista näytteistä, ELISA:lla kyettiin tunnistamaan 7 ja loppuja 7 näytettä ei voitu tunnistaa E7-positiiviseksi. Nämä tulokset viittaavat siihen, ettei ELISA-menetelmä ole käyttökelpoinen kliinisessä käytössä, mutta herättää paljon kysymyksiä tulevia tutkimuksia varten. Tutkimuksessa kerätyn tiedon pohjalta voidaan ehdottaa, että korkean riskin papilloomaviruksien, (esimerkiksi HPV18) E7-onkoproteiini olisi hyödyllinen kohdunkaulan syövän tunnistamisessa. (Ehehalt ym. 2012.)

Apolipoproteiini H (ApoH) on ihmisen plasman proteiini, joka kykenee sitoutumaan useisiin viruksiin spesifisesti. Tutkimuksessa tunnistettiin ELISA-menetelmällä ryhmän A rotavirus ulostenäytteistä ja tätä menetelmää esitetään mahdolliseksi käyttää myös muiden virusten tunnistamisessa. Rotavirukset aiheuttavat valtaosan akuuteista gastroentriiteistä lapsilla maailmanlaajuisesti. ApoH-ELISA:a verrattiin yleisesti käytettyyn kvantitatiiviseen real-time PCR:ään, ja erottamaan oikeat positiiviset näytteet negatiivisista genomisen vastaavuuden mukaan. Myös muita immunologisia menetelmiä käytettiin. Tutkimuksessa käytettiin klinisiä näytteitä (n:15), jotka oli varastoitu diagnosoinnin jälkeen. Näytteet oli tutkittu yleisesti käytetyillä immunologisilla menetelmillä ja genotyyppitetty PCR:llä. Valituissa näytteissä oli hallitsevia virustyyppejä, jotka ovat esiintyneet lähivuosina Euroopassa. Menetelmän havaittiin olevan sensitiivinen ja spesifinen tunnistamaan yleisiä ja harvinaisia rotavirustyyppejä sekä mahdollisia zoonooseja rotavirusisolaatteja. Näytteiden vähäisyys oli rajoite tutkimuksessa, tarkoituksena on ollut osoittaa menetelmän periaatteet ja käyttökelpoisuus. Menetelmää tulee tutkia vielä laajemmilla katsauksilla kliinisillä ulostenäytteillä, että siitä saataisiin tulevaisuudessa diagnostinen menetelmä rotavirusten tunnistukseen. ApoH-ELISA –menetelmän on todettu olevan verrattavissa real-time PCR-menetelmään, jota käytetään yleisesti rotaviruksen diagnosoinnissa. (Adlhoch ym. 2011.)

Dengue on yksi vakavimmista moskiiton välittämistä virusinfektioista trooppisissa maissa. Aikainen diagnosointi on tärkeää potilaan hoidolle ja tässä tutkimuksessa arvioidaan kahden kaupallisen dengue NS1 –testin käyttöä dengue viruksen tunnistamisessa. Dengue-viruksen tuottama NS1-glykoproteiini on olennainen viruksen replikaatiossa, tosin sen toimintaa ei vielä tiedetä kokonaan. Yleisesti dengue diagnosoidaan real time-PCR:llä, virusisolaatiolla tai tunnistamalla potilaan seerumista dengue-spesifisiä IgM- tai IgG-vasta-aineita. Tässä tutkimuksessa verrattiin kahden kaupallisen menetelmän, Panbio NS1 antigen capture ELISA-kitin ja SD bioline Dengue NS1 antigen test-kitin toimintaa varhaisen denguen diagnostiikassa. 91 kliinistä näytettä kerättiin vuonna 2008 syyskuun ja lokakuun välisenä aikana New Delhin Army Hospital –sairaalassa potilailta, joilla epäiltiin dengue-infektiota. Näytteistä tehtiin ELISA-testi, antigeenitesti immunokromatografisena menetel-



mänä, real time-PCR ja virusisolaatio. Tuloksien perusteella ELISA-menetelmää voisi mahdollisesti käyttää denguen varhaisdiagnostiikassa. ELISA-menetelmä on kehitetty tunnistamaan NS1-proteiini dengue-taudin akuutissa vaiheessa. NS1-antigeeniä ei löytynyt potilailta, joilla oli diagnosoitu japanilainen aivotulehdus-virus tai keltakuume-virusinfektio, minkä myötä dengue NS1-antigeenillä ei ole reaktiivisuutta muihin lähellä denguevirusta oleviin flaviviruksiin. ELISA-kitin osoitettiin olevan korkeaampi sensitiivisyydeltään verrattuna immunokromatografiseen antigeenitestiin. (Shrivastava, Dash, Tripathi, Sahni, Gopalan, & Lakshmana 2011.)

HIV-1 –infektion diagnoosiin lapsilla tarvitaan testi, jolla on korkea diagnostinen tarkkuus, se on yksinkertainen suorittaa ja kustannusvaikuttava. Lasten HIV-1 –infektiota kuivatusta kokoveripisaranäytteestä on tutkittu Up24 HIV-1 –menetelmällä, tässä tutkimuksessa menetelmää on yksinkertaistettu, jotta se olisi käyttökelpoisempi kliinisessä työssä ympäristöissä, joissa resurssit rajoittavat toimintaa. Tutkimuksen näytteet kerättiin 6 viikkoa vanhoilta Malawilaisilta lapsilta kantapäapistoksesta. Tässä tapaus-verrokkitutkimuksessa näytteistä 113 oli HIV-infektoituneita ja 109 negatiivisia, HIV-1 DNA PCR –menetelmä toimi vertailumenetelmänä. Yksinkertaistetun HIV-1 Up24 –menetelmän sensitiivisyys oli 84 % ja spesifisyys 98 %. Yksinkertaistettu menetelmä saattaa olla käyttökelpoinen rajoitteisissa olosuhteissa tämän tutkimuksen mukaan. Kuitenkin, infektion varmistustesti tulee tehdä, ennen kuin vauvalle voidaan aloittaa antiretroviraalinen hoito. Useilla tutkimuksilla on osoitettu menetelmän olevan käyttökelpoinen lasten HIV-infektion diagnostiikassa, tärkeintä tutkimuksen kannalta kuitenkin on, että menetelmä on validoitu HIV-1 alatyypille C, josta johtuu yli 95 % Malawin HIV-infektioista. (Mwpasa ym. 2011.)

Suu- ja sorkkataudin diagnosointi on yleisesti tapahtunut sandwich ELISA-menetelmällä yhdistettynä viruksen viljelyllä soluviljelyssä. Kyseisillä menetelmillä on ollut matala sensitiivisyys suu- ja sorkkataudin diagnostiikassa. Real time –PCR ELISA ja RNA dot hybridization –menetelmät ovat osoittaneet 1000-kertaista sensitiivisyyttä sandwich ELISA:an verrattuna. Tutkimuksessa tutkittiin perinteisellä ELISA-menetelmällä näytteitä, jotka olivat negatiivisia. Real time –PCR ELISA ja RNA dot hybridization –menetelmät kykenivät tunnistamaan tutkimuksessa viraalista genomia, jota aiempi ELISA-menetelmä ei tunnistanut. (Mohapatra ym. 2006.)

## 7.2 Muiden mikrobien tunnistaminen

Monoklonaalisiin vasta-aineisiin perustuva nopea dip-stick ELISA-menetelmä kehitettiin samanaikaiseen toksiinia tuottavan ja tuottamattoman *Vibrio cholerae*n suoraan tunnistamiseen peräaukon näytteistä potilailta ja ympäristön vesinäytteistä. Menetelmä arvioitiin Intiassa 75 näytteestä, jotka kerättiin sairaalahoidossa olevilta ripulipotilailta ja 50 ympäristöstä kerätystä vesinäytteestä. 52 potilasnäytettä ja 2 vesinäytettä tulkittiin positiivisiksi CtxB-antigeenin suhteen, joka määrittää *V. cholerae*n toksiseksi. Yksi vesinäyte oli positiivinen ompW-antigeenin suhteen, jonka avulla voidaan tunnistaa lajispesifisesti *V. cholerae*n esiintyminen. Nämä tulokset olivat identtisiä, verrattuna PCR:ään ja tavanomaisen viljelyn tuloksiin. Menetelmää voisi mahdollisesti käyttää luotettavasti aikaisen vaiheen toksiseen tai ei-toksiseen kolera-infektion tunnistamiseen kliinisistä ja ja ympäristönäytteistä. (Tuteja, Kumar, Shukla, Kingston & Batra 2007.)

Kaakkois-Turkissa suoritetussa tutkimuksessa verrattiin kahta diagnostista testiä amebiaasin tunnistamiseen. 380 ulostenäytettä kerättiin ja niistä tutkittiin *Entamoeba histolytica*n löytymistä valomikroskoopilla ja ulosteen antigeenitestillä (TechLab *Entamoeba histolytica* II). Ulostenäytteistä tehtiin kolme valmistetta mikroskopointia varten: tuorenäyte, lugolpreparaatti ja trichrome-preparaatti. Tutkimuksen tarkoitus oli tutkia amebiaasin esiintyvyyttä käyttämällä ELISA-testiä. Tutkimuksen potilaat kärsivät ripulista tai punataudista. ELISA-menetelmä on ainoa menetelmä, jolla saadaan erotettua amebiaasia aiheuttava *E. histolytica* ei-patogeenisesta *E. disparista*. *E. histolytica* ja *E. disparia* ei kykene erottamaan morfologisesti ja tutkitussa ELISA-menetelmässä parasiitit kyettiin erottamaan niiden epitooppien eri sitoutumispaikoilla galaktoosin adheesiossa. 24 (91/380) prosenttia ulostenäytteistä olivat positiivisia *E. histolytica*/*E. dispar* -parasiittien trofosoittien tai kystien mikroskooppisessa tunnistamisessa trichrome-värjäyksen avulla. Antigeenitestin avulla *E. histolytica* tunnistettiin 13 prosentista (51/380) ulostenäytteistä. ELISA-menetelmän avulla pystyttiin erottamaan ei-patogeenisten *E. dispar*-infektioiden määrää, jolloin pystytään myös pienentämään tarpeettomien hoitojen kustannuksia. (Tanyukel ym. 2005.)

Tuberkuloosi-infektion tunnistamisen rutiinimenetelmiä ovat acid-fast bacilli -värjäys ja mykobakteeriviljely. AFB-viljelyn sensitiivisyys on huono johtaen vääriin diagnooseihin ja viljelyn tulos voi kestää 6-8 viikkoa. Uusia menetelmiä, muun muassa DNA-hybridisaatio ja PCR on kehitetty, mutta niihin vaaditaan laadukkaita laboratorioita, kalliita laitteita ja korkeasti koulutettua henkilökuntaa. Rajallisiin ympäristöihin, joissa tuberkuloosin esiintyvyys on korkeaa, tulisi kehittää nopea, taloudellinen, sensitiivinen ja spesifinen testi, jota tutkimuksen ELISA-testi mahdollisesti esittää. Ag85-kompleksilla on osoitettu olevan suuri rooli mykobakteerin fysiologiassa. Kompleksin proteiineja voidaan havaita keuhkotuberkuloosia sairastavan ihmisen ysköksestä ja tuberkuloosin aiheuttamassa aivokalvontulehduksessa selkäydinnesteestä, minkä vuoksi sitä on esitetty tuberkuloosi-infektion markeriksi. Tutkimuksessa kehitetty ELISA-menetelmä hyödyntää tuotettuja vasta-aineita Ag85-kompleksia vastaan, joita havaitaan mykobakteerisen viljelyn filtraateista. Tutkimuksessa kehitettiin uusi, nestemäinen viljely-ympäristö mykobakteereille, ja viljelyn filtraateista analysoitiin useina päivinä Ag85-proteiinien läsnäoloa viljelyn jatkuessa samanaikaisesti. Uutta ELISA-menetelmää verrattiin rutiineihin mykobakteerien viljelytapoihin. Sata yskösnäytettä tutkittiin menetelmän kehittämisessä. Kaikki näytteet viljeltiin rutiinilla mykobakteeriviljelyllä ja BACTEC™ MGIT™ 960 -mykobakteerien tunnistusjärjestelmällä. Tutkimuksessa havaittiin, että uudella ELISA-menetelmällä pystyttiin diagnosoimaan tuberkuloosi-infektio nopeammin ja 86,2 % sensitiivisyydellä sekä 94 % spesifisyydellä. Rutiiniviljelyn tulosten kesto oli keskiarvoltaan 55,2 päivää, BACTEC™ MGIT™ 960 -menetelmällä 41,4 päivää ja uudella ELISA-menetelmällä 8,8 päivää. (Phunpae ym. 2014.)

Bruselloosi-infektio herättää paljon huolta julkisessa terveydenhuollossa ja aiheuttaa taloudellisia menetyksiä yhteisölle taudin esiintymisalueilla. Infektion diagnosointi on vaikeaa, sillä kliiniset oireet eivät ole spesifisiä kaikissa tapauksissa ja diagnosointiin tulee käyttää paljon hematologisia ja biokemiallisia testejä. Bruselloosi esiintyy monella eri tavalla ja sillä on monia eri taudinvaiheita, joita pyritään kartoittamaan jatkuvasti. Vaikka diagnoosin teossa on edistytty, bruselloosi on edelleen yleinen, maailmanlaajuinen zoonoosi tauti. *Brucella* -lajia on tähän päivään mennessä löydetty kuusi

eri muotoa, bakteerit elävät muun muassa karjassa, vuohissa, lampaissa ja sioissa. Kolme bakteeria, *B. melitensis*, *B. abortus* ja *B. suis* aiheuttavat useimmat bruselloosi-infektiot niin ihmisillä kuin eläimillä. Serologisia testejä käytetään useimmiten bruselloosin laboratoriodiagnostiikassa. Koska bruselloosin diagnostiikalle ei ole standardisoitua referenssiantigeeniä, tulee aina huomioida käytetyn antigeenin lähde, joka voi vaikuttaa testin tulokseen. ELISA-menetelmää käytetään monimutkaisiin ja kroonisiin tapauksiin, kun muut testit ovat negatiivisia, mutta potilaalla epäillään silti tautia. ELISA-menetelmällä voidaan tunnistaa spesifiset IgG, IgM ja IgA –immunoglobuliinit potilaasta. 96-kaivoisen kuoppalevyn pinta on päällystetty brucella-bakteerin antigeenillä, johon potilaan näytteen immunoglobuliinit kiinnittyvät. Useiden tutkimuksien perusteella ELISA:a pidetään hyvänä menetelmänä serologisena tutkimuksena bruselloosin diagnostiikassa. (Araj 2010.)

## 8 WESTERN BLOT –MENETELMÄN KÄYTTÖ MIKROBIOLOGIASSA

### 8.1 Virusten tunnistaminen

Colorado tick fever (CTF) on koltiviruksen aiheuttama, puutiaisen välittämä tauti, jota esiintyy Yhdysvaltojen länsiosissa ja Kanadassa. 200–400 tapausta raportoidaan vuosittain Yhdysvaltojen endemisillä alueilla. CTF-infektion diagnosointi tapahtuu useilla eri menetelmillä, joista luotettavimmaksi menetelmäksi on raportoitu viruksen isolaatio ja tunnistaminen. Serologiset menetelmät, kuten ELISA ovat myös kehittyneet, mutta myös useita kantoja pystytään tunnistamaan biomolekulaarisin menetelmin. Western blot –menetelmällä kyettiin tunnistamaan eri CTF-virusten proteiineja, jopa akuutin faasin proteiineja, jotka olivat ELISA:n mukaan negatiivisia. Tutkimuksissa löydettiin vasta-aineiden sitoutuneen 38-kDa –alueelle, ja kyseisen bandin voimakkuus vaihteli taudin eri vaiheiden mukaan. Kyseinen proteiini voi mahdollisesti olla aikaisen vaiheen markkeri CTF-virusinfektioille. Western blot –menetelmällä pystytään lisäämään CTF-infektion diagnostiikan sensitiivisyyttä ja tulosten perusteella serologisista menetelmistä vain Western blot –menetelmää voidaan käyttää taudin aikaisen vaiheen diagnostiikassa. Tutkimuksessa ehdotetaan että CTF-infektion diagnosoinnin luotettavin menetelmä olisi spesifinen ja sensitiivinen biomolekulaarinen menetelmä, jolla kyetään tunnistamaan infektiota taudin eri vaiheissa. (Attoui, Billoir, Bruey, de Micco, & de Lamballerie, 1998.)

Ebolavirukset aiheuttavat vakavan verenvuotokuumeen ihmisille, kyky tunnistaa nämä virukset on siksi erittäin tärkeää. Kehittyneisiin diagnostisiin menetelmiin, kuten sandwich ELISA:an ja Western blot –menetelmään tarvitaan vasta-aineita, jotka tunnistavat luotettavasti ebolaviruksen pinnan glykoproteiinia GP<sub>1,2</sub> tai lyhennettyjä variantteja, joita tuotetaan infektioituneista soluista. Raportissa kuvataan uuden ebolavirus-spesifisen vasta-ainepaneelin kehittämistä. Tuotettujen vasta-aineiden puhtaus testattiin elektroforeesilla SDS-PAGE:n avulla. Monoklonaalisten vasta-aineiden tuotannossa käytettiin Western blot –menetelmää varmistamaan tuotettujen proteiinien olevan immunoglobuliineja. Menetelmällä kyettiin havaitsemaan noin 55 kDa:n bandi, joka tunnistettiin piparjuuriperoksidasiin konjugoidulla kanin anti-IgG:llä. Vasta-aineiden kehittäminen voi luoda tulevaisuudessa yhä monipuolisempia diagnostisia menetelmiä tautien diagnostiikkaan. (Ou ym. 2011.)

Brasilian São Paulossa suoritetussa tutkimuksessa tutkittiin ihmisen lymfotrooppisen virusinfektion (HTLV-1 ja HTLV-2) varmistusmenetelmää riskiryhmillä. Tutkimuksessa verrattiin Western blot –menetelmää, tavanomaista PCR:ää ja real time PCR:ää. Potilaiden diagnosointi on ollut vaikeaa, kun heillä on ollut sekä HTLV1/2- ja HIV-infektio tai muu riski HTLV-infektioille. Kahta eri immunologista menetelmää (EIA), joilla on erilaiset ominaisuudet, on esitetty riskiryhmien infektioiden seulontaan ennen varmistusmenetelmän käyttöä. Tutkimuksessa 73 näytettä 959 näytteestä antoi positiivisen tuloksen vähintään yhdessä immunologisen menetelmän testissä ja analysoitiin sen jälkeen Western blot –menetelmällä. 48 näytettä analysoitiin positiivisiksi Western blot –menetelmällä, 41 tavanomaisella PCR:llä ja 42 real time PCR:llä. Tutkimuksessa havaittiin, että Western blot –menetelmä oli sensitiivisempi verrattuna PCR-menetelmiin, kuitenkin PCR:n avulla kyettiin tunnistamaan virusinfektio Western blot-menetelmän intermediaaneista näytteistä. PCR-menetelmät ovat myös halvempia verrattuna Western blot –menetelmään. Herää keskustelua, kumpaa menetelmää tulisi käyttää en-

siksi infektion varmistamisessa immunologisten testien jälkeen. Tutkimuksessa todettiin, että São Paulossa tulisi menetellä HTLV-1/2 –infektion epäilyssä niin, että kahden immunologisen testin jälkeen positiiviset näytteet analysoidaisiin real time PCR:llä. PCR-negatiiviset näytteet tulisi vielä analysoida Western blot –menetelmällä infektion varmistamiseksi. Kyseisellä tavalla saavutetaan säästöjä, koska Western blot –menetelmä on kallis ja sillä saadaan suuri määrä intermediaaneja tuloksia, jotka tulee vielä varmistaa. (Costa, Magri, & Caterino-de-Araujo 2011.)

Lähes 25 vuoden ajan Yhdysvalloissa HIV-infektion serologinen diagnosointi on tapahtunut kahden vaiheen mukaan, ensin immunologisella menetelmällä ja sitten Western blot –menetelmällä diagnosoimalla varmistamiseksi. Western blot –menetelmän avulla ei kyetä erottamaan HIV-1 ja HIV-2 –infektioita ja akuuttia primaaria infektiota. HIV-2 –Western blot –menetelmää käytetään vain HIV-2 infektiota epäiltäessä, sillä se ei ole yleinen Yhdysvalloissa. Uutta Bio-Rad Multispot HIV-1/HIV-2 Rapid Test immunologista testiä on esitetty korvaamaan Western blot- tai immunofluoresenssimenetelmä varmistavana menetelmänä HIV-infektion diagnostiikassa. Multispot-menetelmällä voidaan erottaa HIV-1 ja HIV-2 –infektiot sekä infektoitumattomat näytteet. Uutta menetelmää verrattiin Western blot –menetelmään, jolloin Multispot tunnisti 172/205 (83,9%) HIV-positiivisista näytteistä ja Western blot 141/205 (68,8%) positiivisista HIV-näytteistä. Multispot tunnisti HIV-1 tartunnoissa matalan vasta-ainetiitterin omaavia, Western blot –menetelmällä saatuja intermediaaneja näytteitä tehokkaammin. Tämän tutkimuksen tulosten perusteella Multispotin oletetaan olevan Western blot –menetelmän sijaan käyttökelpoinen kliinisten näytteiden HIV-infektion varmistamiseen, jotka ovat toistuvasti reaktiivisia ensimmäisenä suoritettavalla immunologisella menetelmällä. (Cárdenas, Baughan, & Hodinka 2013.)

Immunologisten menetelmien kehittyminen HIV-infektion tunnistamisessa on johtanut uusiin ehdotuksiin infektion diagnostiikassa. Uudella algoritmilla infektion seulonta ja varmistustesti suoritettaisiin kahdella tai kolmella immunologisella menetelmällä ja varmistustestinä toiminutta Western blot –menetelmää ei enää vaadittaisi. Uudeksi varmistusmenetelmäksi on esitetty Bio-Rad Multispot Rapid HIV-1/HIV-2 Test immunologista menetelmää, joka kykenisi myös erottamaan HIV-1 ja HIV-2 vasta-aineet. Tutkimuksessa verrattiin kolmannen sukupolven immunologista menetelmää, jota seurasi Multispot-testi ja kolmannen sukupolven immunologista testiä, jota seurasi Western blot –menetelmä. 22.5.2007-30.5.2010 välisenä aikana kerättiin 81 373 kokoverinäytettä New Yorkin Department of Health and Mental Hygiene Public Health Laboratory (PHL) –laboratorioon eri sairaaloista ja muista toimipisteistä HIV-infektion diagnosoimiseksi varten. Reaktiivisen immunologisen testin jälkeen suoritettulla Multispot- ja Western blot –menetelmällä oli sama sensitiivisyys verrattuna HIV-1 infektion tunnistamiseen. Multispotin etuna on sen kyky tunnistaa HIV-2 –infektio näytteistä, jotka olivat Western blot –menetelmällä HIV-1 intermediaaneja tai HIV-1 positiivisia. Multispot kykeni myös tunnistamaan kolme akuuttia HIV-infektiota jotka olivat Western blot-menetelmällä negatiivisia tai intermediaaneja. Spesifisyyden ja sensitiivisyyden määrittämiseen tarvitaan nukleinihappoihin perustuvia tunnistusmenetelmiä (NAT), jotta voidaan validoida eri algoritmien käyttökelpoisuus reaktiivisen seulontatuloksen jälkeen HIV-infektion diagnostiikassa. (Torian, Forgione, Punsalang, Pirillo & Oleszko 2011.)

Pandorin ym. (2013) tutkimuksessa on tutkittu myös Multispot HIV-1/HIV-2 Rapid Test –menetelmää, joka on Yhdysvalloissa vuonna 2013 ruoka- ja lääkeviraston hyväksymä testi HIV-infektion varmistamisessa HIV-1 Western blot –menetelmän ja immunofluoresenssimenetelmän kanssa. Multispot-menetelmää voidaan käyttää HIV-infektion varmistamiseen toistuvasti reaktiivisen seulontatestin jälkeen. 1.9.2011–1.9.2012 välisenä aikana kerättiin 37 876 ihmiseltä näytteet kahdessatoista eri paikassa uuden HIV-infektion tutkimiseksi. Näytteet analysoitiin niin kutsutuilla neljännen sukupolven immunologisella testillä ja toistuvasti reaktiiviset näytteet analysoitiin Multispot-testillä ja HIV-1 Western blot –menetelmällä tai immunofluoresenssimenetelmällä riippuen analysointipaikasta. Multispot-, Western blot- tai immunofluoresenssimenetelmällä saadut negatiiviset tulokset analysoitiin HIV-1 RNA –menetelmällä tuloksen varmistamiseksi. Tutkimuksessa Multispotilla todettiin olevan etu HIV-1- ja HIV-2-infektioiden tunnistamisessa, se on erittäin yhtäpitävä Western blot- ja immunofluoresenssimenetelmään verrattuna. Tutkimuksessa todettiin myös, että seulontakokeen reaktiivisen tuloksen jälkeen varmistustestin negatiivisia tuloksia voi ilmetä kaikissa menetelmissä. Tämän vuoksi HIV-1 RNA-menetelmän tärkeys on erittäin tärkeää etenkin akuuttien HIV-infektioiden diagnostiikassa. (Pandorin ym. 2013.)

## 8.2 Muiden mikrobien tunnistaminen

Parakokkidiodomykoosi (PCM) on vakava systeeminen mykoosi tauti, jota aiheuttaa *Paracoccidioides brasiliensis*. Tautia esiintyy Latinalaisen Amerikan maissa ja se voi johtaa kuolemaan hoitamattomana. Taudin diagnosointi tapahtuu mykologisilla tai histopatologisilla tutkimuksilla. Taudin tutkimiselle on kehitetty myös monia serologisia tutkimuksia, kuten komplementin fiksaatio, double immunodiffusion –menetelmä (DID), ja ELISA. DID on yleisimmin käytetty serologinen referenssitesti taudin diagnosoinnille, hoidolle ja sen monitoroinnille. Kuitenkaan serologisten menetelmien sensitiivisyys ja spesifisyys eivät ole riittäviä taudin varmalle diagnosoinnille. Tutkimuksessa tutkittiin Western blot –menetelmää ja sen sensitiivisyyttä serologisena menetelmänä parakokkidiodomykoosin tunnistamisessa. 517 potilaalta kerättiin seeruminäytteet, jotka analysoitiin Western blot –menetelmällä ja double-immunodiffusion –menetelmällä. Double immunodiffusion –menetelmällä 140 (27 %) seeruminäytettä oli positiivisia ja Western blot- menetelmällä 250 (48,4 %). Kaikki positiiviset DID-menetelmän tulokset olivat positiivisia myös Western blot –menetelmällä. Käytännön työskentelyssä, Western blot –menetelmää esitetään mahdolliseksi käytettäväksi yhdessä double immunodiffusion –menetelmän (DID) kanssa, jolloin saadaan erityisesti parempaa tietoa negatiivisista DID-näytteistä. Tutkimus suoritettiin suurilla näytemäärillä ja tulosten perusteella Western blot –menetelmää ehdotetaan parakokkidiodomykoosin diagnostiikkaan sen turvallisuuden, luotettavuuden ja nopeiden tulosten saavuttamisen vuoksi. (Perenha-Viana, Gonzales, Brockelt, Machado, & Svidzinski 2012.)

Kystinen ekinokokkoosi on zoonoosi tauti muun muassa Turkissa, jota aiheuttaa heisimatoihin kuuluva *Echinococcus granulosus*. Kilimcioğlun ym. (2013) tutkimuksessa Manisassa, Turkissa 4275 opiskelijalta tutkittiin infektiota ultraäänien avulla ja vasta-aineita ekinokokkoosia vastaan tutkittiin Western blot –menetelmän ja ELISA:n avulla 2034 opiskelijalta koko tutkimusjoukosta. Yleisesti ekinokokkoosi diagnosoidaan kuvantamismenetelmillä, alvelolaarisen ekinokokkoosin tunnistuksessa

keuhkoissa käytetään röntgentutkimusta ja kystisen ekinokokkoosin tunnistamisessa vatsan sisäelimiä ultraääntä. Tutkimuksessa haluttiin tutkia kystisen ekinokokkoosin esiintyvyyttä eri diagnostisilla menetelmillä ja verrata Western blotin ja ELISA:n kelpoisuutta ultraäänen joukkokatsauksissa. Serologisilla menetelmillä on havaittu olevan heikompi spesifisyys rutiinianalytiikassa. Western blot –menetelmällä on saatu korkeampi spesifisyys, minkä myötä sitä käytetään useissa laboratorioissa luotettavana infektion varmistusmenetelmänä. Tutkimuksessa Western blot -menetelmän positiiviset tulokset vastasivat ultraäänen positiivista löydöstä, kun ajonäytteistä löytyi vähintään kolme bandia kyseisistä kohdista: 8, 28, 32, 38, 42, 47, 70 ja 90 kDa. Tutkimuksessa todettiin, että Western blot on yleisesti suositeltu menetelmä vahvistamaan kystinen ekinokokkoosi sensitiivisen immunologisen testin jälkeen, mutta Western blot:ia ei suositella suurien joukkokatsausten seulontaan menetelmän suurien kustannusten vuoksi. (Kilimcioğlun ym. 2013.)

Syfilis on *Treponema pallidum* –bakteerin aiheuttama infektio, ja taudin vaiheet luokitellaan primääriin, sekundaariseen, aikaiseen latenttiin ja myöhäiseen latenttiin sekä tertiärvaiheeseen. Western blot –menetelmää on käytetty syfiliksen diagnosointiin, kun perinteiset serologiset menetelmät ovat antaneet epäselviä tai reaktiivisia tuloksia. Tutkimuksessa standardisoitiin Western blot –menetelmä, joka tunnista *T. pallidum* IgG –vasta-aineita seeruminäytteestä ja menetelmän avulla kyettiin erottamaan syfilis-infektion eri vaiheet. Tutkimuksessa käytettiin 507 potilasperäistä näytettä. Menetelmällä on 100% sensitiivisyys ja 99,5% spesifisyys ja sitä verrattiin serologisiin menetelmiin syfiliksen tunnistamisessa. Taudin kliiniset vaiheet kyettiin tulkitsemaan ajon TpN15-TpN47 bandien välillä. Bandi TpN47 on havaittavissa jokaisessa syfilis-infektion vaiheessa, sen voimakkuus vaihteli vaiheen mukaan. Se voi kuitenkin hävitä taudin tertiärisessä vaiheessa. Positiivinen tulos Western blot –menetelmällä saavutettiin, kun vähintään yksi bandi esiintyi ajossa, joka vastasi molekyylipainoltaan TpN15, TpN17, tai TpN47 aluetta. Western blot –menetelmää on käytetty syfiliksen diagnosointiin, kun perinteiset serologiset menetelmät ovat antaneet epäselviä tai reaktiivisia tuloksia. Tutkimuksen tulosten perusteella kyseinen Western blot –menetelmä on teknisesti käyttökelpoinen menetelmä niin infektion varmistusmenetelmänä kuin taudin kliinisten vaiheiden tunnistamisessa. (Antunes de Lemos, Belém, Santos & Ferreira 2007.)

Toksokarioosi on *Toxocara*-matojen aiheuttama zoonoosi infektio, joista kaksi, *Toxocara canis* ja *Toxocara cati* voivat aiheuttaa infektion ihmiselle. Infektion diagnosointi toksokarioosin yleisissä muodoissa, viskeraalinen larva migrans (VLM) ja piilevä toksokarioosi, voi tapahtua visuaalisesti mikroskoipoimalla esimerkiksi kudospäytettä, minkä jälkeen infektion varmistus tapahtuu TES-ELISA:lla, ja positiiviset tulokset tulee analysoida edelleen Western blot –menetelmällä. TES-ELISA-menetelmän TES-antigeeni kerätään naarasmatojen munista. Western blot –menetelmällä kyetään havaitsemaan IgG-vasta-aineita TES-antigeeniä kohtaan ja positiivisessa näytteessä ilmenee neljä bandia matalan molekyylipainon alueella: 24, 28, 30 ja 35 kDa sekä kolme bandia korkean molekyylipainon alueella: 132, 147 ja 200 kDa. TES-ELISA ja Western blot ovat toksokarioosin diagnostiikassa hyvä yhdistelmä, sillä TES-ELISA tarjoaa nopean ja suhteellisen halvan menetelmän negatiivisten tulosten löytämiseen, ja Western blot –menetelmän avulla kyetään parantamaan sekä sensitiivisyyttä että spesifisyyttä taudin diagnostiikassa. (Fillaux & Magnaval 2013.)

Creutzfeldt-Jakobin tauti on vaikea erottaa kliinisesti muista hermostoa rappeuttavista sairauksista. Kudospatologian avulla, joko aivobiopsialla tai ruumiinavauksella voidaan saavuttaa luotettava taudin diagnosointi. Creutzfeldt-Jakobin taudissa kudossiopsian muutokset voi olla hankala havaita, minkä vuoksi proteaasi-resistentin prioniproteiinin ( $\text{PrP}^{\text{res}}$ ) tunnistaminen on olennaista taudin diagnosoinnille. Tautia aiheuttava prioniproteiini ( $\text{PrP}^{\text{res}}$ ) on normaalin prioniproteiinin ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) muuntunut muoto. Normaalia prioniproteiinia esiintyy useimpien solujen pintarakenteissa, mutta eniten keskushermostossa. Proteaasi-resistenssin prioniproteiinin ( $\text{PrP}^{\text{res}}$ ) tunnistaminen tapahtuu joko immunohistokemiallisella menetelmällä tai Western blot –menetelmällä. Tässä tutkimuksessa esitetään turvallinen menetelmä prioniproteiinin eristämiseen infektoituneista aivoista. Menetelmässä käytetään guanidiinisuoloja kudoksen hajottamiseen ja fenolipresipitaatiota prioniproteiinien erottamiseen. Guanidiinisulolat tuhoavat tehokkaasti näytteen infektoivuutta, minkä vuoksi menetelmää voidaan käyttää useissa tutkimuslaboratorioissa ilman erikoistuneita työtiloja biohasardien näytteiden analysointiin. Tutkimuksessa käytettiin infektoitumattomia aivonäytteitä sekä näytteitä, joissa Creutzfeldt-Jakobin tauti oli jo tunnistettu. Myös alzheimerin tautia sairastaneiden potilaiden aivonäytteitä käytettiin tutkimuksessa, ja myös seeruminäytteitä ja selkäydinnäytteitä otettiin mukaan. Näytteet ajettiin tutkimuksessa Western blot –menetelmällä guanidiinisulojen hajoituksen ja fenolipresipitaation jälkeen SDS-PAGE:n avulla. Geeliltä näytteet siirrettiin PVDF-kalvolle ja immunoblotattiin monoklonaalisella hiiren anti-human-prion 3F4 vasta-aineella. Western blot –menetelmän avulla kyettiin tunnistamaan kaikki tutkimusnäytteiden Creutzfeldt-Jakobin taudin infektoimat aivot. Tutkimuksen menetelmällä aivonäytteitä ei tarvitse pakastaa, sillä guanidiini vakauttaa näytteen biomolekyylit ja sitä voidaan säilyttää huoneenlämmössä useita päiviä. (Bastian, McDermott, Perry, Carver, Dash & Garry 2005.)



## 9 KIRJALLISUUSKATSAUKSEN YHTEENVETO

Yhteenveto tutkimusartikkeleista on tehty opinnäytetyön tarkoituksen perusteella: Miten Western blot- ja ELISA-menetelmiä käytetään mikrobiologiassa. Artikkeleiden analysoinnissa pohdin myös, mitä Western blot ja ELISA-menetelmillä tutkitaan mikrobiologiassa ja mihin tarkoituksiin kyseisiä menetelmiä käytetään?

### 9.1 Yhteenveto ELISA-menetelmien käytöstä mikrobiologiassa

ELISA-menetelmiä käytetään kliinisessä mikrobiologiassa useisiin eri tarkoituksiin, kuten virusten bakteerien ja parasiittien diagnosointiin. Valtaosa tutkimusartikkeleista kertoi virusinfektioiden tunnistamisesta, kuten H7 lintuinfluenssan, eri gastrointestinaalivirusten, aivotulehduksen aiheuttavien virusten, papilloomavirusten, HI-viruksen ja dengue-infektiota aiheuttavan viruksen detektiosta. Kolerainfektion, tuberkuloosin ja brucelloosin tunnistaminen olivat bakteereiden tunnistamiseen liittyviä tutkimusartikkeleita. Kaikkien tutkimusten tulokset eivät olleet luotettavia, mikä vaikuttaa mahdolliseen tulevaan käyttöön kliinisessä laboratoriossa. Esimerkiksi Eehaltin ym. (2012) tutkimuksessa yritettiin tunnistaa papilloomaviruksen HPV 18 E7 -onkogeeniä kohdunkaulanäytteestä ELISA-menetelmällä. Kuitenkaan menetelmällä ei kyetty tunnistamaan onnistuneesti kaikkia positiivisia kohdunkaulanäytteitä, minkä vuoksi menetelmä ei tällä hetkellä olisi valmis kliiniseen käyttöön, mutta kyseisen onkoproteiinin tunnistamisella voisi olla merkitys kohdunkaulan syövän tunnistamisessa ja ehkäisyssä. Myös kaupallisten gastrointestinaalivirusten tunnistamisessa (Rovida ym. 2013) kaikkien virusten tunnistaminen ei onnistunut sensitiivisyydeltään parhaiten. Noroviruksen tunnistukseen käytetty kitti ei olisi täysin käyttökelpoinen kliinisen diagnoosin teossa, mutta se voisi olla käyttökelpoinen infektioiden seulonnassa epidemia-aikaan.

ELISA-menetelmillä on monia eri tarkoituksia. ELISA:lla tunnistetaan infektion aiheuttajia muun muassa ulosteesta, kohdunkaulan näytteistä, verinäytteistä ja myös ympäristön vesinäytteistä. ELISA-menetelmällä on etuja, että siitä kyetään tekemään yksinkertaisia, kustannusvaikuttavia ja nopeita menetelmiä, minkä vuoksi sen käyttökelpoisuus on suuri alueilla, joissa ei ole varaa ylläpitää kalliita laboratorioita ja osaavaa henkilökuntaa. Osa menetelmistä on tarkoitettu infektion tunnistamiseen potilasnäytteestä, yleensä ELISA-menetelmä on paljon nopeampi menetelmä verrattaessa esimerkiksi virusten tunnistamisessa paljon käytettyä virusisolaatiota, jonka tulokseen voi kulua pitkä aika. Shrivastavan (2011) tutkimuksessa tutkittiin denguetta aiheuttavan viruksen kaupallisten ELISA-kittien kelpoisuutta viruksen tunnistuksessa. Kuten tutkimuksessa mainitaan, aikaisella diagnosoinnilla on merkittävä osa potilaan hoidon ennustetta, ja paljon nopeammalla ELISA-menetelmällä kyettäisiin diagnosoimaan infektio paljon nopeammin. ELISA-menetelmää on myös otettu paljon käyttöön maihin ja alueisiin, joissa resursseja ei ole riittävästi, että saataisiin ylläpidettyä laboratorioita, joissa on paljon kalliita laitteita ja osaavaa henkilökuntaa. Tämän vuoksi esimerkiksi Mwpanan ym. (2011) tutkimuksessa on kehitetty lasten HIV-infektion tunnistamiseen ELISA-kittiä, jolla saataisiin tunnistettua sairastuneita lapsia myös harvaanasutuilla, hankalasti tavoitettavilla alueilla. ELISA-kitti olisi käyttökelpoinen työkalu eroteltaessa negatiivisia ja positiivisia näytteitä, kuitenkin positiivisen tuloksen kohdalla, tulisi potilas aina varmistaa uudella testillä HIV-infektion varmistamiseksi. Myös

Tutejan ym. (2007) tutkimuksessa kehitettiin nopea, yksinkertainen ja kustannusvaikuttava menetelmä koleran toksisen ja ei-toksisen infektion tunnistamiseen harvaanasutuilla alueilla ja kenttätyössä. Tutkimustulokset osoittivat menetelmän olevan hyvä sensitiivisyydeltään ja spesifisyydeltään, minkä vuoksi menetelmää voisi suositella käyttöön koleran tunnistamisessa.

Tanyukselin ym. (2005) tutkimuksessa kehitettiin ELISA-menetelmä, jonka avulla kyetään erottamaan amebiaasia aiheuttava patogeeninen *E. histolytica* tautia aiheuttamattomasta *E. disparista*. Uuden ELISA-menetelmän avulla kyettiin erottamaan nämä kaksi eri lajia toisistaan, mikä ei perinteisen mikroskopian avulla ole mahdollista. Uudella menetelmällä kyetään erottamaan ei-patogeeniset infektiot ja täten pienentämään tarpeettomia hoitoja ja kustannuksia. Phunpaen ym. (2014) tutkimuksessa kehitettiin uusi viljelymenetelmä tuberkuloosi-infektion tunnistamiseen ja uuden, nestemäisen viljely-ympäristön filtraateista määritettiin uudella ELISA-menetelmällä Ag85-proteiinin läsnäoloa ilman, että viljely keskeytyi. Uusi ELISA-menetelmä kykeni tunnistamaan tuberkuloosi-infektion 8,8 päivässä, kun rutiiniviljelyn tulosten kesto oli 55,2 päivää. Bruselloosi-infektiossa ELISA-menetelmää käytetään, kun potilaalla epäillään tautia ja muut testit ovat negatiivisia. ELISA-menetelmää käytetään monimutkaisiin ja kroonisiin tapauksiin bruselloosi-infektion diagnostiikassa. (Araj 2010.)

## 9.2 Yhteenveto Western blot –menetelmien käytöstä mikrobiologiassa

Western blot –menetelmä on tärkeä osa laboratorioanalytiikassa ja tutkimustyössä sen korkean spesifisyyden ja sensitiivisyyden vuoksi. Sitä käytetään diagnostisena menetelmänä ja useiden infektioiden diagnostiikassa varmistusmenetelmänä, jolla varmistetaan infektio yhden tai useamman seulontakokeen jälkeen. Artikkeleissa ilmeni usein Western blot –menetelmän kyky parantaa tietyn taudin diagnosoinnin sensitiivisyyttä, kuten Attouin, (1998) Colorado tick fever (CTF) viruksen tunnistamisessa. Myös Costan ym. (2011) tutkimuksessa HTLV-1/2 –infektioissa Western blot –menetelmän avulla kyettiin kasvattamaan virusinfektion tunnistamisen sensitiivisyyttä, mutta koska menetelmä on kallis, tulisi sitä käyttää viimeisenä menetelmänä infektion diagnostiikassa. Fillauxin ja Magnavalin (2013) tutkimuksessa *Toxocara*-matojen aiheuttaman toksokarioosin diagnostiikassa on myös käytetty Western blot –menetelmää varmistusmenetelmänä positiivisen seulontakokeen jälkeen. Tutkimuksessa Western blot –menetelmällä pyrittiin parantamaan taudin diagnosoinnin sensitiivisyyttä ja spesifisyyttä. Western blot –menetelmää käytettiin myös uusien vasta-aineiden kehittämisessä, kuten Oun ym. (2011) tutkimuksessa kerrotaan. Vasta-aineiden kehitys luo luotettavampia menetelmiä tautien diagnostiikkaan, ja Western blot –menetelmän avulla kyetään varmistamaan tuotettujen proteiinien olevan immunoglobuliineja eli vasta-aineita. Vaikka Western blot on luotettava ja sensitiivinen keino tunnistaa useita infektiosairauksia, usein menetelmän käytön korkeat kustannukset vaikuttavat, käytetäänkö kyseistä menetelmää. Esimerkiksi Costan ym. (2011) tutkimuksessa HTLV-1/2 –infektion tunnistamisessa Western blot –menetelmää käytettiin vasta, kun kahden positiivisen seulontakokeen jälkeen näyte olisi PCR-menetelmällä negatiivinen. Western blot –menetelmällä pyrittiin varmistamaan näytteen tulos ristiriitaisten seulontakokeiden ja varmistavan PCR-menetelmän välillä.

Western blot on ollut tärkeä osa HIV-infektion diagnostiikassa, ja sitä käytetään infektion varmistamiseen immunologisten seulontatestien jälkeen. Western blot –menetelmän tilalle on kuitenkin esitetty immunologista Multispot HIV-1/HIV-2 Rapid Test –menetelmää, joka korvaisi mahdollisesti Western blotin HIV-infektion varmistamismenetelmänä. Cárdenasin (2013), Torianin (2011) ja Pandorin (2013) tutkimuksissa vertailtiin Multispot- ja Western blot –menetelmiä HIV-infektion varmistamisessa, kun näytteet oli analysoitu ensin immunologisilla seulontamenetelmillä. Tutkimusten perusteella Multispot voi mahdollisesti tulla HIV-infektion varmistusdiagnostiikkaan, sillä sen avulla kyetään erottamaan myös HIV-1/2 –infektiot toisistaan yhdellä testillä, mihin Western blotilla ei kyetä. Multispotilla pystyttiin havaitsemaan myös akuutteja infektiota, jotka jäivät Western blot –menetelmällä intermediaaneiksi tai negatiivisiksi. Pandorin ym. (2013) tutkimuksessa kuitenkin huomioitiin HIV-infektion nukleinihappoihin perustuva määrittäminen, sillä niin Multispotilla, Western blotilla kuin immunofluoresenssimenetelmällä on saatu negatiivisia tuloksia infektion varmistustestistä, vaikka seulontakoe olisi ollut reaktiivinen. Western blot –menetelmä on aikaa vievä ja hintava analyysi, minkä vuoksi uusien varmistusmenetelmien kehittäminen HIV-infektion diagnostiikassa on varmaa. Tässä Multispot on hyvä esimerkki, sillä se on hyväksytty Yhdysvalloissa vuonna 2013 Yhdysvaltain ruoka- ja lääkeviraston päätöksellä yhdeksi varmistusmenetelmäksi HIV-infektion diagnostiikkaan HIV-1 Western blot- ja immunofluoresenssimenetelmän ohella.

Parakokkidiomykoosi on vakava mykoosi tauti, jota esiintyy Latinalaisen Amerikan maissa ja hoitamattomana se voi johtaa kuolemaan. Infektion diagnostiikassa Western blot –menetelmällä kyettiin tunnistamaan *Paracoccidioides brasiliensis* –sienen aiheuttama tartunta spesifisemmin verrattuna double immunodiffusion –menetelmään. Tutkimuksessa Western blot –menetelmää ehdotettiin parakokkidiomykoosi-infektion diagnostiikkaan menetelmän spesifisyyden, turvallisuuden, luotettavuuden ja nopeiden tulosten saamiseksi. (Perenha-Viana ym. 2012.) Kilimcioğlun ym. (2013.) tutkimuksessa Turkissa verrattiin Western blot –menetelmän toimivuutta ultraääneseen kystisen ekinokokkoosi-infektion tunnistamiseen suurissa joukkokatsauksissa. Kystinen ekinokokkoosi tunnistetaan yleisesti ultraäänellä ja Western blot –menetelmää on korkean spesifisyyden vuoksi käytetty infektion varmistusdiagnostiikassa. Tutkimuksessa selvisi, että Western blot –menetelmää voidaan käyttää infektion varmistamiseen sensitiivisen immunologisen testin jälkeen, mutta sitä ei suositella joukkokatsauksien seulontaan suurien kustannusten vuoksi.

Western blot –menetelmää on käytetty Antunes de Lemosin ym. (2007) tutkimuksessa tunnistamaan Syfilis-infektion taudin vaiheet. Western blot –menetelmää on käytetty, kun perinteiset serologiset menetelmät ovat antaneet epäselviä tai reaktiivisia tuloksia. Tutkimuksen perusteella, kyseinen Western blot –menetelmä on käyttökelpoinen niin infektion varmistuksessa kuin syfilis-infektion kliinisten vaiheiden tunnistamisessa. Bastianin ym. (2005) tutkimuksessa kehitettiin uusi, turvallinen menetelmä prioniproteiinien eristämiseen Creutzfeldt-Jakobin tautia sairastaneen henkilön aivoista. Kudoksen hajottamiseen käytettiin guanidiinisuoloja, jotka tuhoavat näytteen infektoimiskykyä tehokkaasti. Prioniproteiinien erottamiseen käytettiin fenolipresipitaatiota. Näytteet analysoitiin Western blot –menetelmällä ja sen avulla kyettiin tunnistamaan kaikki tutkimuksessa olleet infektoituneet näytteet. Uusi menetelmä prioniproteiinien erottamiseen aivokudoksesta heikentää merkittävästi kudoksen infektoimiskykyä näytteen käsittelyssä.

## 10 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS

### 10.1 Opinnäytetyön luokittelu

Opinnäytetyöt voidaan jakaa muun muassa tutkielmatyyppeihin ja monimuotoisiin opinnäytetöihin. Kumpikin edellämainituista opinnäytetöistä on tutkimuksellisia, sillä ne perustuvat tutkittuun tietoon, yhdistävät teoretietoa ja ammatillista käytäntöä. Tutkielmatyypissä opinnäytetyössä tavoitteena on ratkaista kysymys, testata hypoteesia tai tuottaa uutta keskeistä alan tietoa. Monimuotoinen työ, jota voidaan kutsua myös toiminnalliseksi tai hankkeistetuksi opinnäytetyöksi koostuu usein kahdesta osasta: kirjallisesta raportista ja tuotoksesta. Tuotos on kehitetty ja tuotettu opinnäytetyötä työstettäessä ja se voi olla esimerkiksi käyttöohje, perehdyttämisoas, palvelu, toimintatapa, kirja, kansio, portfolio, verkkosivusto tai luentosarja. Monimuotoisessa opinnäytetyössä työn tavoite on kehittävä, käytännöllinen ja soveltava. (Roivas & Karjalainen 2013, 79-80.)

Opinnäytetyöni on mielestäni niin tutkielmatyypinen kuin monimuotoinen. Opinnäytetyöni koostuu teoriaosuudesta ja kirjallisuuskatsauksesta, jonka osaa olen painottanut työssäni. Opinnäytetyöni tarkoitus oli selvittää Western blot- ja ELISA-menetelmien käyttöä mikrobiologiassa. Tavoitteenani opinnäytetyössäni oli koota yhteen tutkimustietoa Western blot- ja ELISA-menetelmien käytöstä mikrobiologiassa. Pyrin hakemaan kirjallisuuskatsaukseni avulla tietoa Western blot – ja ELISA-menetelmistä mikrobiologiassa opinnäytetyölleni asettaman tavoitteen mukaan. Opinnäytetyön aiheistosta ja kirjallisuuskatsauksesta tuotin tuotoksena posterin, jossa kuvaan opinnäytetyöni tuloksia. Posterin tekeminen kuuluu toiminnalliseen opinnäytetyöhön ja posterin avulla pyrin kuvaamaan opinnäytetyöni sisältöä ja tuloksia.

### 10.2 Opinnäytetyöprosessi

Ammattikorkeakoulututkintoon johtaviin opintoihin kuuluu opinnäytetyö ammattikorkeakouluista annetun asetuksen (4.7.2013/546 4§; 16.6.2005/423 7§) mukaan. Ammattikorkeakoulututkinnoissa opinnäytetyö on laajudeltaan 15 opintopistettä. Opinnäytetyöllä pyritään kehittämään ja osoittamaan opiskelijan valmiuksia tiedon ja taitojen soveltamisessa ammattiopintoihin liittyvissä asiantuntijatehtävissä. Opinnäytetyö on prosessi, joka alkaa työn ideasta, ja kehittyy työsuunnitelmaan, työn toteutukseen, tulosten julkistamiseen ja työn arviointiin. Opinnäytetyöhön ammattikorkeakoulussa kuuluu olennaisesti soveltava kehittäminen. Opiskelijan työmäärään opinnäytetyössä kuuluvat itsenäinen työskentely, seminaarit, joihin kuuluvat työsuunnitelman ja valmiin opinnäytetyön esittely sekä op-ponointi ja ohjauskeskustelut. Opetussuunnitelman mukaisesti opinnäytetyöprosessi koostuu kolmesta vaiheesta: Opinnäytetyöhön orientoituminen ja suunnittelu (4 op), Opinnäytetyön toteutus (10 op) ja Opinnäytetyön viimeistely ja julkistaminen (1 op). (Savonia 2014; Savonia 2013.)

Tein opinnäytetyöni aihekuvauksen syksyllä 2013, jolloin työn aiheita haettiin vielä paljon opinnäytetyön ohjaajan kanssa. Tarkoituksena oli kuitenkin tehdä kirjallisuuskatsaus immunologisesta menetelmästä. Syksyn aikana aihe rajautui Western blot- ja ELISA-menetelmiin. Kirjallisuuskatsauksen tekeminen kiinnosti minua ja tiesin, että opinnäytetyöni aihe vaatisi minulta paljon aikaa ja kärsivälli-

syöttä. Kirjallisuuskatsaukseen pyysin ohjausta Savonian kirjaston informaattikolta syksyllä 2013, minkä myötä eri hakutietokantojen käyttäminen helpottui. Kirjallisuuskatsauksen tekeminen voi tarjota opiskelijalle suuren mahdollisuuden oppia sekä kartuttaa opiskelijan menetelmätietoa. Kirjallisuuskatsauksen laatiminen vaatii työtä, sillä tutkijan tulee lukea ja ajatella kriittisesti sekä arvioida kriittisesti toisiinsa suhteuttaen tutkimusten eri näkökulmia, tutkimusasetelmia ja -tuloksia. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2004, 112-113.)

Aloitin työsuunnitelman kirjoittamisen jo keväällä 2014 ollessani harjoittelussa Itävallassa. Syksyn 2014 aikana suoritin kirjallisuuskatsauksen kirjallisuushaun samalla kun kirjoitin työsuunnitelmani valmiiksi. Kirjallisuuskatsaukseni artikkelit olivat kahdesta eri hakutietokannasta, ScienceDirectistä ja Pubmedistä. Työsuunnitelmani hyväksyttiin lokakuussa 2014 ja esitin työsuunnitelmani opinnäytetyöpajassa 2.12.2014. Opinnäytetyöni aiheen rajaaminen onnistui mielestäni, mutta en ole täysin tyytyväinen kirjallisuushakuuni. En tosin tiedä, olisinko kyennyt saamaan hausta parempaa tämänhetkisiä taidoillani. Opinnäytetyön aiheen rajaaminen on yksi suurimmista haasteista työn onnistumisen kannalta. Tavoitteiden tulisi olla yksiselitteisiä ja niiden ilmaisun opinnäytetyössä tulisi selvitä lukijalle helposti. (Roivas & Karjalainen 2013, 81.)

Tieteelliseltä tutkimukselta edellytetään kurinalaisuutta ja järjestelmällisyyttä. Tutkimuksella on tiettyjä ehtoja, tietoa tulisi tuottaa hyväksytyjen metodien avulla. Metodeiksi kutsutaan perustellusti ja tietoisesti valittuja keinoja tutkimuksen toteutuksessa. Metodeita ovat teoria, käsitteet, mallit, tutkimusmenetelmät, aineiston keräämisen tavat, analyysitavat ja argumentointi. Tieteellisessä tutkimuksessa tulee olla myös täsmällisyyttä: Tutkimuksessa tulisi aina esittää tutkimuksen tutkimusongelma, tutkimuskysymykset ja tavoitteet. Myös tutkimusmenetelmä, aineiston keräämisen tapa, teoreettinen viitekehys, analyysitapa sekä tutkimustulokset ja johtopäätökset tulisi esittää täsmällisesti. (Vilka 2005, 27-28.) Opinnäytetyöprosessini aikana pyrin kuvaamaan työtäni mahdollisimman selkeästi, että kirjoitustyöstäni näkyisi edes hieman tutkimuksellinen ote. Sillä opinnäytetyöprosessini on hyvin teoriapainotteinen, on tärkeää kuvata ja kirjoittaa opinnäytetyötäni yllämainittujen metodien mukaan. Selkeä työskentely helpottaa opinnäytetyön ymmärtämistä kokonaisuutena ja sen ymmärtäminen voi olla helpompaa työtä lukevalle ulkopuoliselle henkilölle. Kirjoitusprosessini aikana koin hyväksi työkaluksi aiempien opinnäytetöiden lukemisen, sillä niistä sai hyviä vinkkejä oman työn jaksottamiseen ja tärkeiden osioiden sisällyttämiseen omaan opinnäytetyöhön. Yleensä kysymykset, jotka vaivasivat kirjoitusprosessin aikana, selvisivät jo vain lukemalla muiden opiskelijoiden opinnäytetöitä.

Opinnäytetyön avulla opiskelija osoittaa hallitsevansa tutkimusviestinnän periaatteita: sopivan jäsentämisen raportoinnissa, raportin tyylin, vakuuttavan argumentoinnin ja lähteiden luotettavan merkitseminen. Opinnäytetyö on aina uusi, itsenäinen työ, jossa kuuluu käyttää alan käsitteitä ja näyttää perehtyneisyyttä alan tutkimustyöhön. Opinnäytetyössä näkyy opiskelijan kyky muokata tekstiä ja tuoda oma äänensä kuuluviin. Kuitenkin opinnäytetyön tekstin tulee olla neutraalia ja toteavaa. (Roivas & Karjalainen 2013, 85.) Opinnäytetyössäni opin hankkimaan luotettavaa teorian tietoa, mutta myös analysoimaan sitä, ja löytämään teksteistä omalle opinnäytetyölleni merkittävät asiat. Opinnäytetyön riittävällä rajauksella ja tavoitteiden mukaisella analysoinnilla pyrin löytämään merkittävää

tietoa ja ilmaisemaan sen mahdollisen selkeästi. Kirjallisuuskatsauksen onnistuneelle tekemiselle merkittäviä tekijöitä olivat oikeat kysymykset, joiden avulla etsin tietoa. Pyrin hankkimaan koko opinnäytetyöprosessin aikana tietoa mahdollisimman luotettavista lähteistä, kuten eri hakutietokannoista, koulun kirjallisuudesta, opetusmateriaaleista ja kootuista teoksista, joiden tekemiseen olivat osallistuneet useat alan asiantuntijat. Pyrin myös huomioimaan lähteiden ikää: Tiedon kehittyessä jatkuvasti, uusimpana julkaistu tieto voi tarjota parhaiten ajantasalla olevaa tietoa kyseessä olevasta asiasta.

Opinnäytetyön ja posterin viimeistely tapahtui vuoden 2015 tammikuun ja helmikuun aikana. Opinnäytetyön kielenohjauksen suoritti Savonia ammattikorkeakoulun äidinkielenopettaja, työn kielen hionnassa apuna oli myös ABC-paja. Esitin opinnäytetyöni opinnäytetyöseminaarissa 12.3.2015.

### 10.3 Poster

Poster on yleinen tapa tuoda esille tutkimustyötä ja sen tuloksia lähes jokaisella tieteenalalla. Poster on tietotaulu tai tutkimusjulistte ja se voidaan jakaa kahteen eri tyyppiin: tieteelliseen ja ammatilliseen posteriin. Poster on juliste, ilmoitus tai mainos, jonka avulla pyritään lähettämään visuaalinen viesti katsojalle. Se sisältää tekstiä, kuvia, taulukoita, joiden avulla pyritään tuomaan esille tutkimusta tai muuta tietoa. Sitä voidaan käyttää myös opetusmenetelmänä välittämään tieteellistä tietoa, raportoimaan projekteista, markkinoimaan tuotetta tai tiedottamaan tuotteesta. (Perttilä 2007; Tepponen, Välimäki, Suominen 1998, 309.)

Tieteellinen posteri kuvaa tutkimusta ja sen tuloksia lyhyellä ja ytimekkäällä tavalla. Tieteellisen posterin sisältö koostuu johdannosta, aineisto- ja menetelmäkuvauksista, tuloksista ja johtopäätöksistä. Ammatillinen posteri kuvaa mahdollisesti yksittäisen ryhmän toimintaa, projektia ja sen tapahtumia. Poster on hyvin vapaamuotoinen ja mainostavassa posterissa kuvien käyttö on laajempaa tekstin jäädessä vähäisemmälle osuudelle. (Perttilä 2007.) Tieteellisessä posterissa on tarkoitus kuvata tutkimus ja sen tulokset lyhyesti ja ytimekkäästi sekä herättää tieteellistä keskustelua. Posterin tulisi olla kokonaisuus, jonka kykenisi ymmärtämään akateemiselta taustaltaan vaihtelevat lukijat. Posterin tarkoitus on tuoda tietoa ihmisille uudesta asiasta ja jakaa tietoa suurillekin ihmisjoukoille. Yleensä posterit tavoittavat enemmän ihmisiä ja pidemmällä ajanjaksoilla verrattuna esimerkiksi esitelmään. Posterin sisältö ja esittelytapa vaikuttavat sen tieteellisyyteen. Posterin teossa on myös tärkeää muistaa kohdeväestö, jolle posterit on suunnattu. (Silen 2012; Leinonen & Särkämö 2007.)

Posterin tekeminen oli minulle henkilökohtaisesti huolta aiheuttava osa opinnäytetyöprosessissani, sillä en ole tottunut työskentelemään paljon eri tietoteknisten sovellusten kanssa. Aloitin posterin suunnittelun tammikuussa 2015, kun olin kirjoittanut valmiiksi materiaalin, joka tulisi posterin sisältöön. Tein posterin Power point -ohjelmalla ja posterin kooksi valittiin A0. Posterin kokoamisessa käytin Leinosen ja Särkämön (2007) ohjetta tieteellisen posterin tekoon. Posteria tehdessä, pyrin yksinkertaiseen ja hyvin jäsennellyyn työhön, jotta posterin lukeminen olisi helppoa niin opiskelijoille, kuin muillekin posteria lukeville ihmisille.

Posterin teon aikana huomasin, että halusin posteristani olevan toivottavasti edes jonkinlaista hyötyä opiskelijalle, joka mahdollisesti lukee posteria. On vaikea tulkita, onko posterini enemmän ammatillinen vai tieteellinen. Ammatillisuus tulee ilmi posterissa siten, että olen halunnut selventää myös Western blot- ja ELISA-menetelmiä, jotta opiskelijalla voisi olla jonkinlainen käsitys kyseisistä menetelmistä. Näin posterista voi olla hyötyä opiskelijalle.

## 11 POHDINTA

### 11.1 Kirjallisuuskatsaus

Kirjallisuuskatsauksen tekeminen oli haastava ja paljon kärsivällisyyttä vaativa osa opinnäytetyössäni. Kirjallisuuskatsauksen selkeä taulukointi helpotti ymmärtämään koko kirjallisuuskatsauksen laajuutta ja sen sisältöä. Kirjallisuuskatsaukseni oli menetelmällisesti kuvaileva kirjallisuuskatsaus: Pyrin kuvaamaan katsauksessani haluttuja ilmiöitä ja niihin liittyviä ominaisuuksia. Kirjallisuuskatsaustani voi kuvailla yleiskatsaukseksi. Mielestäni Western blot- ja ELISA-menetelmistä olisi varmasti löytynyt vielä mielenkiintoisempia artikkeleita, jos olisin kyennyt hallitsemaan hakukoneita paremmin. Kuitenkin kirjallisuuskatsauksen jokainen artikkeli vastaa mielestäni tietyillä tavoin opinnäytetyöni tarkoitusta: selvitin Western blot- ja ELISA-menetelmien käyttöä mikrobiologiassa. Olen painottanut kirjallisuuskatsauksen osuutta opinnäytetyössäni, ja työsuunnitelman tekovaiheessa kirjallisuuskatsauksen tekeminen vei paljon aikaa ja omaa työpanosta, että siitä sai koottua selkeän ja johdonmukaisen kokonaisuuden.

ELISA-menetelmiä kehitetään koko ajan ja mielestäni niiden merkitys tulee kasvamaan tulevaisuudessa. ELISA-menetelmillä voidaan saavuttaa tuloksia nopeasti, sillä menetelmä ei vaadi paljon aikaa ja se on suhteellisen yksinkertainen käyttää. ELISA-menetelmillä pystytään nopeuttamaan laboratorioprosessia, että potilas saisi mahdollisesti tehokkaammin ja nopeammin halutun hoidon. ELISA-menetelmää tullaan mielestäni hyödyntämään niin laboratorioden rutiinianalytiikassa kuin spesifisissä ja ainutlaatuisissa laboratorioanalyyseissä, mutta myös alueilla joissa terveydenhuollon varat eivät mahdollisesti riitä ylläpitämään tehokkaita laboratorioita ja osaavaa henkilökuntaa. ELISA-menetelmien kehittäminen vierimenetelmiksi ja mukaan kenttätööhön otettaviksi lisää niiden arvoa alueilla, joissa muuten olisi erittäin hankala suorittaa laboratorioanalytiikkaa ja muita mittauksia.

Western blot –menetelmän vahvuuksia on sen kyky spesifisyyteen ja sensitiivisyyteen eri tutkimusten analytiikassa. Tämän vuoksi Western blot tulee pysymään tutkimustyössä, sillä sitä käytetään niin rutiinianalytiikassa kuin tutkimustyössä varmistusmenetelmänä ja vertailumenetelmänä tutkimustyössä otettaessa esimerkiksi uusia menetelmiä mahdolliseen käyttöön laboratorioanalytiikassa. Western blot –menetelmä vaatii osaavan henkilökunnan, jotta analyysin tulokset olisivat luotettavia. Menetelmällä on myös enemmän kuluja, minkä vuoksi kyseistä menetelmää käytetään viimeisenä varmistusmenetelmänä kun muilla, halvemmilla analyyseillä on saavutettu haluttuja tuloksia. Kirjallisuuskatsaukseni perusteella Western blot –menetelmä on ollut ja tulee olemaan tärkeä osa HIV-infektion diagnostiikassa. Kuitenkin immunologiset menetelmät ovat ottamassa jalansijaa HIV-infektion varmistusdiagnostiikassa, mikä on yleisesti tehty Western blot –menetelmällä. Immunologisten menetelmien kehittyessä Western blot –menetelmä voi mahdollisesti siirtyä taka-alalle mikrobiologian laboratorion diagnostiikassa, mutta menetelmä on edelleen tehokas ja tärkeä osa tutkimustyötä ja laboratorioanalytiikkaa.



## 11.2 Opinnäytetyön eettisyys

Tutkimustyötä tehtäessä tulisi välttää epärehellisyyttä tutkimuksen jokaisessa vaiheessa. Tieteelliseen toimintaan liittyy periaatteita, joiden huomioonottaminen vaikuttaa tutkimuksen eettisyyteen. On vaativaa tehdä tutkimus, jonka eettiset näkökohdat tulee huomioida oikein ja riittävin tavoin. Tutkimuksen tekemisessä toisen tekemää työtä, tekstiä, ei plagioida ja lainaus merkitään työhön asianmukaisin lähdemerkinnöin. Tutkimuksessa ja sen julkaisussa muiden tutkijoiden osuutta ei tule vähätellä, eikä ryhmän jäsen voi kokea yhteisen aineiston olevan hänen omaa. Tutkijan ei tule itseplagioida omaa tutkimustaan, jolloin tuotettaisiin näennäisesti uutta tietoa, muuttamalla tutkimuksessa pieniä osia tuloksista. Tutkimuksen tuloksia ei saa yleistää ilman kritiikkiä, eikä tulosten raportointi saa olla harhaanjohtavaa tai puutteellista. Tutkimuksen menetelmät tulee kuvata luotettavasti ja myös tutkimuksessa tulleet puutteet tulee tuoda esille. Tutkimuksessa käytettyjä määrärahoja tulee käyttää tarkoituksen mukaan. (Hirsjärvi ym. 2004, 25-28.)

Tässä opinnäytetyössä eettisyyteen eniten vaikuttava tekijä on itse tutkija, sillä työssä on analysoitu ja koottu muiden tekemää tutkimustietoa. Tutkija on vastuussa siitä, onko tietoa käsitelty niin, että tulokset eivät ole harhaanjohtavia tai puutteellisia. Tutkijan omat mielipiteet tai johtopäätökset eivät saa muuttaa tiedon alkuperäistä merkitystä. On hyvin vaikea arvioida omaa työskentelyäni eettisestä näkökulmasta, sillä olen halunnut analysoida ja koota tietoa mahdollisimman todenmukaisesti. Tosin oma kykyni tällaisen tiedon ymmärtämiseen ei ole mahdollisesti riittävän hyvä, mikä saattaa vaikuttaa siihen, olenko ymmärtänyt kaikki asiat oikein haluamistani huolimatta. Posterin tekemisessä tärkeää on, että siitä löytyvä tieto olisi luotettavaa. Posterin lukijan tulisi luottaa siihen, että posterissa oleva tieto on laadukasta ja käyttökelpoista, minkä avulla lukija voisi hyötyä posterin lukemisesta. Posterin tekemisessä eettisyyttä on myös se, että tuottaisin mahdollisimman laadukkaan ja luotettavan posterin, jota lukija voisi tutkia ilman epäilystä tiedon oikeellisuudesta.

## 11.3 Oman oppimisen ja ammatillisen kehittymisen arviointi

Opinnäytetyöni tekeminen on kehittänyt merkittävästi tiedonhakutaitojani. Kirjoitusprosessin aikana olen myös oppinut ajattelemaan kriittisemmin tietoa, sen alkuperää, luotettavuutta ja merkitystä. Tiedon analysointi, etenkin englannin kielellä oli pitkä prosessi, minkä myötä olen ylpeä aikaansaamastani työstä, mutta samalla mietin kuinka paljon paremmin olisin voinut analysoida materiaaleja. Sillä tein elämäni ensimmäistä kertaa kirjallisuuskatsauksen, on vaikea verrata itseään. Uskon, että toisella kerralla kyky analysoida tietoa ja löytää merkittävät asiat olisi täysin erilainen.

Opinnäytetyön tekeminen on lisännyt paljon luottamusta omiin taitoihin tuottaa, kehittää ja analysoida tekstiä. Pitkän kirjoitusprosessin aikana huomaa oman kehittymisensä ja myös oman työn kriittisen arvioinnin. Työn edetessä omien virheiden löytäminen sai huomaamaan oman kehittymisen opinnäytetyöprosessin aikana. Opinnäytetyöni ei ole niin työelämälähtöinen, kuin olisin halunnut. Kirjallisuuskatsauksen artikkelit eivät lisänneet omaa tietotaitoani siitä, miten paljon ja mihin tarkoituksiin Western blot- ja ELISA-menetelmiä käytetään Suomessa klinisissä laboratorioissa. Se ei tosin ollutkaan tavoite opinnäytetyössäni, mutta työtäni ei ole helppo liittää työelämään muuten kuin me-

netelmäkuvausten osalta. Opinnäytetyöni voi herättää myös pohdintaa siitä, eroavatko eri maiden laboratorioanalytiikka kuinka paljon toisistaan esimerkiksi kliinisen mikrobiologian laboratoriossa.

Opinnäytetyöni osoittaa ainakin kiinnostukseni tutkimustietoon ja eri menetelmiin. Opinnäytetyöni hyviä puolia on, että olen kyennyt osoittamaan itselleni kyvyn hankkia ja etsiä tietoa. Mielestäni työelämässä kyseiset asiat eivät ainakaan heikennä omia taitojani tulevana bioanalyttikkona, sillä laboratoriot kehittyvät koko ajan. Uusien menetelmien ja tutkimustiedon kehittyessä työntekijöillä tulisi olla halu kehittää omaa tietotaitoaan muun kehityksen mukana. Tai ainakin minun mielestäni asioiden ymmärtäminen lisää kiinnostusta ja motivaatiota työn tekemiseen. Opinnäytetyöprosessini on opettanut itselleni tärkeitä seikkoja: Tulevaisuudessa tiedän olevani kykenevä tuottamaan omaa materiaalia ja työskentelemään oman mukavuusalueeni ulkopuolella. Opinnäytetyön tekeminen on opettanut jaksottamaan ja aikatauluttamaan omaa työskentelyäni siten, että työ edistyy niin oman kuin ohjaajan vaatimissa aikatauluissa.

## LÄHTEET

Abbas, A., Lichtman, A. & Pillai, S. 2012. *Cellular and molecular immunology*. 7. painos. USA: Elsevier Saunders.

Adlhoch, C., Kaiser, M., Hoehne, M., Mas Marques, A., Stefas, I., Veas, F. & Ellerbrok H. 2011. Highly sensitive detection of the group A Rotavirus using Apolipoprotein H-coated ELISA plates compared to quantitative real-time PCR. *Virology Journal* [verkkojulkaisu]. 2011 nro 8 (63) [viitattu 28.9.2014]. Saatavissa: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3042958/#\\_\\_ffn\\_sectitle](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3042958/#__ffn_sectitle) .

Antunes de Lemos, E., Belém, Z. R., Santos, A. & Ferreira, A. W. 2007. Characterization of the Western blotting IgG reactivity patterns in the clinical phases of acquired syphilis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2007 nro 58 (2), 177-183.

Araj, G. F. 2010. Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2010 nro 36, (1), S12-S17.

Attoui, H., Billoir, F., Bruey, J.M., de Micco, P. & de Lamballerie, X. 1998. Serologic and molecular diagnosis of Colorado tick fever viral infections. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1998 nro 59 (5), 763-768.

Bamford, D., Hyypiä, T. & Saksela K. 2010. Virukset ja prionit sekä niiden aiheuttamat taudit. Virusten yleiset ominaisuudet, rakenne ja luokittelu [verkkojulkaisu]. Teoksessa *Mikrobiologia*. Duodecim Oppikirjat [viitattu 19.11.2014]. Saatavissa: [http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi/koti?p\\_artikkeli=inf04495&p\\_selaus=15355](http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi/koti?p_artikkeli=inf04495&p_selaus=15355) .

Bastian, F. O., McDermott, M. E., Perry, A. S., Carver, L. A., Dash, S. & Garry, R. F. 2005. Safe method for isolation of prion protein and diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Journal of Virological Methods*. 2005 nro 130 (1-2), 133-139.

Cárdenas, A. M., Baughan, E. & Hodinka, R. L. 2013. Evaluation of the Bio-Rad Multispot HIV-1/HIV-2 Rapid Test as an alternative to Western blot for confirmation of HIV infection. *Journal of Clinical Virology*. 2013 nro 58 (1), e97-e103.

Carpenter, A., B. 2011. Immunoassays for the diagnosis of infectious diseases. Teoksessa Versalovic, T., Carrol, K. C., Funke, G., Jorgensen, J. H., Landy, M. L. & Wamock, P. W (toim). *Manual of clinical microbiology*. 10. painos. USA: ASM press.

Costa, E. A. S., Magri, M. C. & Caterino-de-Araujo, A. 2011. The best algorithm to confirm the diagnosis of HTLV-1 and HTLV-2 in at-risk individuals from Sao Paulo, Brazil. *Journal of Virological Methods*. 2011 nro 173 (2), 280-286.

Eehalt, D., Lener, B., Pircher, H., Dreier, K., Pfister, H., Kaufmann, AM., Frangini, S., Ressler, S., Müller-Holzner, E., Schmitt, M., Höfler, D., Rostek, U., Kaiser, A., Widschwendter, A., Zwerschke, W. & Jansen-Dürr, P. 2012. Detection of human papillomavirus type 18 E7 oncoprotein in cervical smears: a feasibility study. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012 nro 50 [2], 246-257.

Feldkamp, C. 2010. Immunological reactions. Teoksessa Kaplan, L. & Pesce, A. (toim.). *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation*. 5. painos. USA: Mosby Elsevier.

Feldkamp, C. 2003. Immunochemical Techniques. Teoksessa Kaplan, L., Pesce, A. & Kazmierczak, S. (toim.). *Clinical chemistry. Theory, Analysis, Correlation*. 4. painos. USA: Mosby Elsevier.

Fillaux, J. & Magnaval, J-F. 2013. Laboratory diagnosis of human toxocariasis. *Veterinary Parasitology*. 2013 nro 193 (4), 327-336.

Halonen, T. 2003. Immunokemiallisten menetelmien periaatteet. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) *Kliniset laboratoriotutkimukset*. Helsinki: WSOY.

He, F., Prabakaran, M., Tan, Y., Indira, K., Kumar SR. & Kwan J. 2013. Development of dual-function ELISA for effective antigen and antibody detection against h7 avian influenza virus. *BMC Microbiology*. 2013 nro 13: 219.

Heikkilä, A., Jokinen, P. & Nurmela, T. 2008. *Tutkiva kehittäminen. Avaimia Tutkimus- ja kehittämissankkeisiin terveysalalla*. Helsinki: WSOY oppimateriaalit Oy.

Heikkilä, R., Hellstén, S., Koukila-Kähkölä, P., Kurkinen, T., Meurman, O., Nummelin, R., Pastila, S., Richardson, M & Ylönen, H. 2005. *Klininen mikrobiologia terveydenhuollossa*. Suomen kuntaliitto. Jyväskylä: Gummerus.

Heino, J. & Vuento, M. 2010. *Biokemian ja solubiologian perusteet*. 2. uudistettu painos. Helsinki: WSOYpro Oy.

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2004. *Tutki ja kirjoita*. 10. painos. Helsinki: Tammi.

Hohnadel, D, C. 2003. Clinical Enzymology. Teoksessa Kaplan, L., Pesce, A. & Kazmierczak, S. (toim.). *Clinical chemistry. Theory, Analysis, Correlation*. 4. painos. USA: Mosby Elsevier.

Hyypiä, T. & Ahola, T. 2007. Virusten lisääntyminen. Teoksessa Huovinen, P., Meri, S., Peltola, H., Vaara, M., Vaheri, A. & Valtonen, V. (toim.) *Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Kirja 1*. Helsinki: Duodecim.

Jensen, E. C. 2012. The Basics of Western blotting. *The anatomical record*. 2012 nro 295:369–371[viitattu 29.1.2014]. Saatavissa: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ar.22424/pdf> .

Johansson, K. 2007. Kirjallisuuskatsaukset – Huomio systemaattiseen kirjallisuuskatsaukseen. Teoksessa Johansson, K., Axelin, A., Stolt, M. & Ääri, R-L. (toim.). *Systemaattinen kirjallisuuskatsaus ja sen tekeminen*. Turku: Turun yliopisto.

Jokiranta, S. & Meri, S. 2010. Parasiitit ja niiden aiheuttamat taudit. Mikä tekee parasiitista patogeenin? [verkkójulkaisu]. Teoksessa *Mikrobiologia*. Duodecim Oppikirjat [viitattu 1.12.2014]. Saatavissa: [http://www.terveysportti.fi.ezproxy.savonia-amk.fi/dtk/oppi/koti?p\\_artikkeli=inf04495&p\\_selaus=15355](http://www.terveysportti.fi.ezproxy.savonia-amk.fi/dtk/oppi/koti?p_artikkeli=inf04495&p_selaus=15355) .

Jokiranta, S. & Seppälä, J. T. 2011. Vasta-ainevälitteinen immunitetti. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. (toim.). *Immunologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 2*. 1. painos. Helsinki: Duodecim.

Kang, X., Li, Y., Fan, L., Lin, F., Wei, J., Zhu, X., Li, J., Chang, G., Zhu, Q., Liu, H. & Yang, Y. 2012. Development of an ELISA-array for simultaneous detection of five encephalitis viruses. *Virology Journal*. 2012 nro 9 (56).

Kilimcioğlu A. A., Girginkardeşler N., Korkmaz, M., Özkol M., Düzgün F., Östan, I., Pabuşcu, Y., Dinç, G. & Ok, Ü. Z. 2013. A mass screening survey of cystic echinococcosis by ultrasonography, Western blotting, and ELISA among university students in Manisa, Turkey. *Acta Tropica*. 2013 nro 128 (3), 578-583.

Koivunen, M. E. & Krogsrud, R. L. 2006. Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories. *Labmedicine*. 2006 nro 37: 490-497.

Kokki, M., Kuusela, P. & Richardson M. 2007. Johdanto mykologiaan. Teoksessa Huovinen, P., Meri, S., Peltola, H., Vaara, M., Vaheri, A. & Valtonen, V. (toim.). *Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Kirja 1*. Helsinki: Duodecim.

Leinonen, A. & Särkämö, T. 2007. Ohjeita aloittelevalle tieteellisen posterin kirjoittajalle [verkkójulkaisu]. [viitattu 5.1.2015.] Saatavissa: [http://www.helsinki.fi/behav/tiedepaiva/2008/posteriorhjeet\\_yksi%20koko4.07.pdf](http://www.helsinki.fi/behav/tiedepaiva/2008/posteriorhjeet_yksi%20koko4.07.pdf) .

Lequin, R. M. 2005. Enzyme immunoassay (EIA)/Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical Chemistry*. 2006 nro 12: 2415-2418.

- Meri, S. 2011. Johdanto immunologiaan. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. (toim.). *Immunologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 2*. 1. painos. Helsinki: Duodecim.
- Mohapatra, J. K., Sanyal, A., Hemadri, D., Tosh, C., Palani, G., Rasool, T. J. & Bandyopadhyay, S. K. 2006. Development and comparison of genome detection assays for the diagnosis of foot-and-mouth disease suspected clinical samples. *Journal of Virological Methods*. 2006 nro 137 (1), 14-20.
- Morris, G & Gronowski, A. 2010. Laboratory Approaches to Serology Testing. Teoksessa Kaplan, L. & Pesce, A. (toim.). *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation*. 5. painos. USA: Mosby Elsevier.
- Mwapasa V., Cachafeiro, A., Makuta, Y., Beckstead, DJ., Pennel, ML., Chilima, B., Mwagomba, B., Fiscus, SA. & Kwiek, JJ. 2010. Using a simplified immunodeficiency virus type 1 p24 antigen assay to diagnose pediatric HIV-infection in Malawi. *Journal of Clinical Virology*. 2010 nro 49 (4), 299-302.
- Ou, W., Deslie, J., Konduru, K., Bradfute, S., Radozhitzky, S. E., Retterer, C., Kota, K., Bavari, S., Kuhn, J. H., Jahrling, P. B., Kapl, G. & Wilson C. A. 2011. Development and characterization of rabbit and mouse antibodies against ebolavirus envelope glycoproteins. *Journal of Virological Methods*. 2011 nro 174 (1-2), 99-109.
- Paetau, A., Kalimo, H. & Haltia, M. 2010. Virukset ja prionit sekä niiden aiheuttamat taudit. Prionit ja prionitaudit [verkkojulkaisu]. Teoksessa *Mikrobiologia*. Duodecim Oppikirjat [viitattu 19.11.2014]. Saatavissa:  
[http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi/koti?p\\_artikkeli=inf04495&p\\_aineisto=15355&p\\_haku=mikrobiologia](http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi/koti?p_artikkeli=inf04495&p_aineisto=15355&p_haku=mikrobiologia) .
- Pandori, M. W., Westheimer, E., Gay, C., Moss, N., Fu, J., Hightow-Weidman, L. B., Craw, J., Hall, L., Giacotti, F. R., Mak, M. L., Madayag, C., Tsoi, B., Louie, B., Patel, P., Owen, S. M. & Peters, P. J. 2013. The Multispot rapid HIV-1/HIV-2 differentiation assay is comparable with the Western blot and an immunofluorescence assay at confirming HIV infection in a prospective study in three regions of the United States. *Journal of Clinical Virology*. 2013 nro 58 (1), e92-96.
- Penttilä, I. 2003. Elektroforeesin periaate. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) *Kliiniset laboratoriotutkimukset*. Helsinki: WSOY.
- Perenha-Viana, MC., Gonzales, IA., Brockelt, SR., Machado, LN, & Svidzinski TI. 2012. Serological diagnosis of paracoccidioidomycosis through a Western blot technique. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2012 nro 19 (4), 616-619.

Perttilä, A. 2007. *Ohjeita posterin tekoon* [verkkojulkaisu]. Viestintäpiste, Laurea ammattikorkeakoulu [viitattu 18.11.2014]. Saatavissa:

[http://viestintapiste.laurea.fi/ind.pdf.doc.ppt/Posterin\\_suunnittelu.pdf.pdf](http://viestintapiste.laurea.fi/ind.pdf.doc.ppt/Posterin_suunnittelu.pdf.pdf) .

Phunpae, P., Chanwong, S., Tayapiwatana, C., Apiratmateekul, N., Makeudom, A. & Kasinrek, W. 2014. Rapid diagnosis of tuberculosis by identification of Antigen 85 in mycobacterial culture system. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2014 nro 78 (3), 242-248.

Pubmed. *Pubmed* [verkkojulkaisu]. National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine [viitattu 4.10.2014]. Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> .

Roivas, M. & Karjalainen, A-L. 2013. *Sosiaali- ja terveysalan viestintä*. Helsinki: Edita.

Rovida, F., Campanini, G., Sarasini, A., Adzasehoun KM., Piralla, A. & Baldani, F. 2013. Comparison of immunologic and molecular assays for the diagnosis of gastrointestinal viral infections. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2013 nro 75 (1), 110-111.

Salminen, A. 2011. *Mikä kirjallisuuskatsaus? Johdatus kirjallisuuskatsauksen tyyppeihin ja hallintotieteellisiin sovelluksiin* [verkkojulkaisu]. Vaasan yliopisto [viitattu 1.12.2015.]. Saatavissa:

[http://www.uva.fi/materiaali/pdf/isbn\\_978-952-476-349-3.pdf](http://www.uva.fi/materiaali/pdf/isbn_978-952-476-349-3.pdf) .

Savonia 2013. *Opinnäytetyöprosessi opiskelijan toimintana* [verkkojulkaisu]. Savonia ammattikorkeakoulu [viitattu 8.1.2015]. Saatavissa:

[https://reppu.savonia.fi/koulutusalat/terveys\\_kuopio/opinnaytetyo/Documents/ONT\\_PROSESSI\\_Opiskelijan%20toimintana%202014.pdf](https://reppu.savonia.fi/koulutusalat/terveys_kuopio/opinnaytetyo/Documents/ONT_PROSESSI_Opiskelijan%20toimintana%202014.pdf) .

Savonia 2014. *Opinnäytetyö (amk-tutkinto)* [verkkojulkaisu]. Savonia ammattikorkeakoulu [viitattu 8.1.2015]. Saatavissa: <https://reppu.savonia.fi/opinnaytetyo/Sivut/default.aspx> .

Science Direct 2014. *Science Direct* [verkkojulkaisu]. Elsevier B.V. [viitattu 4.10.2014]. Saatavissa: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.savonia-amk.fi/> .

Shrivastava, A., Dash, PK., Tripathi, NK., Sahni, AK., Gopalan, N. & Lakshmana R. PV. 2011. Evaluation of a commercial Dengue NS1 enzyme-linked immunosorbent assay for early diagnosis of dengue infection. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2011 nro 29 (1), 51-55.

Silén, S. 2012. *Tieteelliset posterit viestinnän välineenä* [verkkojulkaisu]. Jyväskylän yliopisto [viitattu 18.11.2014]. Saatavissa: [http://www.biostatistiikanseura.org/Syystapaaminen2012\\_Silen.pdf](http://www.biostatistiikanseura.org/Syystapaaminen2012_Silen.pdf) .

Tanyuksel, M., Yilmaz, H., Ulunkanligil, M., Araz, E., Cicek, M., Koru, O., Tas, Z. & Petri, W. A. 2005. Comparison of two methods (microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay) for the diagnosis of amebiasis. *Experimental parasitology*. 2005 nro 110 (3), 322-326.

Tepponen, H., Välimäki, M. & Suominen, T. 1998. Miten tehdään posterit? Ohjeita posterin suunnittelijalle. *Hoitotiede*. 1998 nro 10 (5), 309.

Thompson, S. G. 2003. Principles for Competitive Binding assays. Teoksessa Kaplan, L., Pesce, A. & Kazmierczak, S. (toim.). *Clinical chemistry. Theory, Analysis, Correlation*. 4. painos. USA: Mosby Elsevier.

Torian, L. V., Forgione, L. A., Punsalang, A. E., Pirillo, R. E. & Oleszko, W. R. 2011. Comparison of Multispot EIA with Western blot for confirmatory serodiagnosis of HIV. *Journal of Clinical Virology*. 2011 nro 57 (1), S41-S44.

Tuteja, U., Kumar, S., Shukla, J., Kingston, J. & Batra, H. V. 2007. Simultaneous direct detection of toxigenic and non-toxigenic *Vibrio cholerae* from rectal swabs and environmental samples by sandwich ELISA. *Journal of Medical Microbiology*. 2007 nro 56 (10), 1340-1345.

Vaara, M., Skurnik, M. & Sarvas, M. 2007. Bakterisolun rakenne ja toiminta [verkkajulkaisu]. Teoksessa *Mikrobiologia*. Duodecim Oppikirjat [viitattu 19.11.2014]. Saatavissa: [http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi/koti?p\\_artikkeli=inf04495&p\\_selaus=15355](http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi/koti?p_artikkeli=inf04495&p_selaus=15355) .

Vilkka, H. 2005. *Tutki ja kehitä*. Helsinki: Tammi.

von Bonsdorff, C.-H., Bamford, D. & Vaheri, A. 2007. Virusten yleiset ominaisuudet, rakenne ja luokittelu. Teoksessa Huovinen, P., Meri, S., Peltola, H., Vaara, M., Vaheri, A. & Valtonen, V. (toim.) *Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Kirja 1*. Helsinki: Duodecim.



## LIITE 1: KIRJALLISUUSHAKU

Pubmed, Western blot

("Blotting, Western/methods"[Mesh]) AND "Microbiology"[Mesh] -haulla saatiin 24 hakutulosta.

Abstraktien lukemisen jälkeen valitsin viisi kohdetta, joita tulen käyttämään kirjallisuuskatsauksessani. Hakua ei rajoitettu muuten, sillä hakutuloksien määrä ei ollut suuri.

Tekijät:	Nimi:	Kuvaus:	Lähde:
Perenha-Viana, MC., Gonzales, IA., Brockelt, SR., Machado, LN, & Svidzinski TI.	Serological diagnosis of paracoccidioidomycosis through a Western blot technique.	Parakokkidioidomykoosi-infektion diagnostiikka Western blot –menetelmällä.	Perenha-Viana, MC., Gonzales, IA., Brockelt, SR., Machado, LN, & Svidzinski TI. 2012. Serological diagnosis of paracoccidioidomycosis through a Western blot technique. <i>Clinical and Vaccine Immunology</i> . 2012 nro 19 (4), 616-619.
Attoui, H., Billoir, F., Bruey, J.M., de Micco, P. & de Lamballerie, X.	Serologic and molecular diagnosis of Colorado tick fever viral infections.	Colorado tick fever (CTF) –taudin diagnostiikka, Western blot yhtenä menetelmänä.	Attoui, H., Billoir, F., Bruey, J.M, de Micco, P. & de Lamballerie, X. 1998. Serologic and molecular diagnosis of Colorado tick fever viral infections. <i>American Journal of Tropical Medicine and Hygiene</i> . 1998 nro 59 (5), 763-768.
Ou, W., Deslie, J., Konduru, K., Bradfute, S., Radozhitzky, S. E., Retterer, C., Kota, K., Bavarri, S., Kuhn, J. H., Jahrling, P. B., Kapl, G. & Wilson C. A.	Development and characterization of rabbit and mouse antibodies against ebolavirus envelope glycoproteins.	Vasta-aineiden kehittäminen Ebola-viruksen tunnistamista varten ja niiden testaaminen muun muassa Western blot –menetelmällä.	Ou, W., Deslie, J., Konduru, K., Bradfute, S., Radozhitzky, S. E., Retterer, C., Kota, K., Bavarri, S., Kuhn, J. H., Jahrling, P. B., Kapl, G. & Wilson C. A. 2011. Development and characterization of rabbit and mouse antibodies against ebolavirus envelope glycoproteins. <i>Journal of Virological Methods</i> . 2011 nro 174 (1-2), 99-109.
Cárdenas, A. M., Baughan, E. & Hodinka, R. L.	Evaluation of the Bio-Rad Multispot HIV-1/HIV-2 Rapid Test as an alternative to Western blot for confirmation of HIV infection.	Bio Rad Multispot HIV-1/HIV-2 –testin arviointi vaihtoehtona Western blot –menetelmälle HIV-infektion varmistuksessa.	Cárdenas, A. M., Baughan, E. & Hodinka, R. L. 2013. Evaluation of the Bio-Rad Multispot HIV-1/HIV-2 Rapid Test as an alternative to Western blot for confirmation of HIV infection. <i>Journal of Clinical Virology</i> . 2013 nro 58 (1),

			e97-e103.
Pandori, M. W., Westheimer, E., Gay, C., Moss, N., Fu, J., Hightow-Weidman, L. B., Craw, J., Hall, L., Giacotti, F. R., Mak, M. L., Madayag, C., Tsoi, B., Louie, B., Patel, P., Owen, S. M. & Peters, P. J.	The Multispot rapid HIV-1/HIV-2 differentiation assay is comparable with the Western blot and an immunofluorescence assay at confirming HIV infection in a prospective study in three regions of the United States.	Tutkimus Multispot HIV-1/HIV-2 -testin käytävyydestä HIV-infektion varmistuksessa, vertailuna käytettiin Western blot –menetelmää ja IFA:a (Immuno Fluorescence Assay).	Pandori, M. W., Westheimer, E., Gay, C., Moss, N., Fu, J., Hightow-Weidman, L. B., Craw, J., Hall, L., Giacotti, F. R., Mak, M. L., Madayag, C., Tsoi, B., Louie, B., Patel, P., Owen, S. M. & Peters, P. J. 2013. The Multispot rapid HIV-1/HIV-2 differentiation assay is comparable with the Western blot and an immunofluorescence assay at confirming HIV infection in a prospective study in three regions of the United States. <i>Journal of Clinical Virology</i> . 2013 nro 58 (1), e92-96.

Science Direct, Western blot

Search results: 69 results found for pub-date > 2003 and TITLE-ABSTR-KEY(western blotting) and TITLE-ABSTR-KEY(diagnosis)[All Sources(Immunology and Microbiology)].

Science Direct- haussa poistin kirjat hakuvaihtoehtoista, ja aiheiden julkaisuväli on vuodesta 2004 nykypäivään. Yhteensä hausta tuli 69 tulosta, joista otsikoiden kiinnostavuuden perusteella luin abstraktit. Abstraktien ja artikkeleiden tutkimisen jälkeen valitsin kuusi artikkelia kirjallisuuskatsaukseeni.

Tekijät:	Nimi:	Kuvaus:	Lähde:
Kilimcioğlu A. A., Girgin-kardeşler N., Korkmaz, M., Özkol M., Düzgün F., Östan, I., Pabuşcu, Y., Dinç, G. & Ok, Ü. Z.	A mass screening survey of cystic echinococcosis by ultrasonography, Western blotting, and ELISA among university students in Manisa, Turkey.	Suuri joukkokatsaus kystisen ekinokokkoosi-infektion diagnostikassa Western blotin, ELISA:n ja ultraäänen avulla.	Kilimcioğlu A. A., Girgin-kardeşler N., Korkmaz, M., Özkol M., Düzgün F., Östan, I., Pabuşcu, Y., Dinç, G. & Ok, Ü. Z. 2013. A mass screening survey of cystic echinococcosis by ultrasonography, Western blotting, and ELISA among university students in Manisa, Turkey. <i>Acta Tropica</i> . 2013 nro 128 (3), 578-583.
Antunes de Lemos, E., Belém, Z. R., Santos, A. & Ferreira, A. W.	Characterization of the Western blotting IgG reactivity patterns in the clinical phases of acquired syphilis.	Syfilis-infektion kliinisten vaiheiden tunnistaminen Western blot-menetelmällä.	Antunes de Lemos, E., Belém, Z. R., Santos, A. & Ferreira, A. W. 2007. Characterization of the Western blotting IgG reactivity patterns in the

			clinical phases of acquired syphilis. <i>Diagnostic Microbiology and Infectious Disease</i> . 2007 nro 58 (2), 177-183.
Costa, E. A. S., Magri, M. C. & Caterino-de-Araujo, A.	The best algorithm to confirm the diagnosis of HTLV-1 and HTLV-2 in at-risk individuals from Sao Paulo, Brazil.	Paras menetelmä HTLV-1 ja HTLV-2 –infektioiden diagnostiikassa riskiryhmään kuuluvilla henkilöillä.	Costa, E. A. S., Magri, M. C. & Caterino-de-Araujo, A. The best algorithm to confirm the diagnosis of HTLV-1 and HTLV-2 in at-risk individuals from Sao Paulo, Brazil. <i>Journal of Virological Methods</i> . 2011 nro 173 (2), 280-286.
Fillaux, J. & Magnaval, J-F.	Laboratory diagnosis of human toxocariasis	Toksokarioosi-infektion diagnostiikka ihmisillä.	Fillaux, J. & Magnaval, J-F. 2013. Laboratory diagnosis of human toxocariasis. <i>Veterinary Parasitology</i> . 2013 nro 193 (4), 327-336.
Torian, L. V., Forgione, L. A., Punsalang, A. E., Pirillo, R. E. & Oleszko, W. R.	Comparison of Multispot EIA with Western blot for confirmatory serodiagnosis of HIV.	Multispot EIA:n ja Western blot -menetelmän vertailu HIV-infektion varmistusdiagnostiikassa.	Torian, L. V., Forgione, L. A., Punsalang, A. E., Pirillo, R. E. & Oleszko, W. R. 2011. Comparison of Multispot EIA with Western blot for confirmatory serodiagnosis of HIV. <i>Journal of Clinical Virology</i> . 2011 nro 57 (1), S41-S44.
Bastian, F. O., McDermott, M. E., Perry, A. S., Carver, L. A., Dash, S. & Garry, R. F.	Safe method for isolation of prion protein and diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease.	Creutzfeldt-Jakobin taudin diagnostiikka.	Bastian, F. O., McDermott, M. E., Perry, A. S., Carver, L. A., Dash, S. & Garry, R. F. 2005. Safe method for isolation of prion protein and diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. <i>Journal of Virological Methods</i> . 2005 nro 130 (1-2), 133-139.

Pubmed, ELISA

"Enzyme-Linked Immunosorbent Assay/methods"[Mesh] AND "Microbiology"[Mesh] AND ("2004/09/30"[PDat] : "2014/09/27"[PDat] AND "humans"[MeSH Terms]) –haulla saattin 90 hakutulosta. Julkaisuväliksi valitsin kymmenen vuotta hakupäivästä (27.9.2014) ja haku rajoitettiin ihmisiin. Hakua rajoittavia filttäreitä jouduin käyttämään, sillä muuten hakutulosten määrä olisi ollut avi-  
an liian suuri. Valitsin kahdeksan hakukohdetta kirjallisuuskatsaukseeni.

Tekijät:	Nimi:	Kuvaus:	Lähde:
He, F., Prabakaran, M., Tan, Y., Indira, K., Kumar SR. & Kwan J	Development of dual-function ELISA for effective antigen and antibody detection against h7 avian influenza virus.	h7 influenssa –viruksen tunnistaminen kahdella tavalla toimivalla ELISA-menetelmällä.	He, F., Prabakaran, M., Tan, Y., Indira, K., Kumar SR. & Kwan J. 2013. Development of dual-function ELISA for effective antigen and antibody detection against h7 avian influenza virus. <i>BMC Microbiology</i> . 2013 nro 13: 219.
Rovida, F., Campanini, G., Sarasini, A., Adzasehoun KM., Piralla, A. & Baldani, F.	Comparison of immunologic and molecular assays for the diagnosis of gastrointestinal viral infections.	Gastrointestinaalisten virusinfektioiden tunnistusmenetelmien vertailu, immunologinen ja molekulaarinen menetelmä.	Rovida, F., Campanini, G., Sarasini, A., Adzasehoun KM., Piralla, A. & Baldani, F. 2013. Comparison of immunologic and molecular assays for the diagnosis of gastrointestinal viral infections. <i>Diagnostic Microbiology and Infectious Disease</i> . 2013 nro 75 (1), 110-111.
Kang, X., Li, Y., Fan, L., Lin, F., Wei, J., Zhu, X., Li, J., Chang, G., Zhu, Q., Liu, H & Yang, Y	Development of an ELISA-array for simultaneous detection of five encephalitis viruses.	ELISA-menetelmä viiden eri aivotulehduksen tunnistamiseen samanaikaisesti.	Kang, X., Li, Y., Fan, L., Lin, F., Wei, J., Zhu, X., Li, J., Chang, G., Zhu, Q., Liu, H & Yang, Y. 2012. Development of an ELISA-array for simultaneous detection of five encephalitis viruses. <i>Virology Journal</i> . 2012 nro 9 (56).
Ehehalt, D., Lener, B., Pircher, H., Dreier, K., Pfister, H., Kaufmann, AM., Frangini, S., Ressler, S., Müller-Holzner, E., Schmitt, M., Höfler, D., Rostek, U., Kaiser, A., Widschwendter, A., Zwerschke, W. & Jansen-Dürr, P	Detection of human papillomavirus type 18 E7 oncoprotein in cervical smears: a feasibility study.	Käyttökelpoisuustutkimus papilloomaviruksen tunnistukseen kohdunkaulan näytteistä.	Ehehalt, D., Lener, B., Pircher, H., Dreier, K., Pfister, H., Kaufmann, AM., Frangini, S., Ressler, S., Müller-Holzner, E., Schmitt, M., Höfler, D., Rostek, U., Kaiser, A., Widschwendter, A., Zwerschke, W. & Jansen-Dürr, P. 2012. Detection of human papillomavirus type 18 E7 oncoprotein in cervical smears: a feasibility study. <i>Journal of Clinical Microbiology</i> . 2012 nro 50 [2], 246-257.
Adlhoch, C., Kaiser, M., Hoehne, M., Mas Marques, A., Stefas, I., Veas, F. & Ellerbrok H.	Highly sensitive detection of the group A Rotavirus using Apolipoprotein H-coated ELISA plates compared to quantitative real-time PCR	A-ryhmän rotaviruksen tunnistus, vertailussa ELISA ja real-time PCR.	Adlhoch, C., Kaiser, M., Hoehne, M., Mas Marques, A., Stefas, I., Veas, F. & Ellerbrok H. 2011. Highly sensitive detection of the group A Rotavirus using Apolipoprotein H-coated ELISA plates compared to quantitative real-time PCR. <i>Virology Journal</i> . 2011 nro 8 (63).
Shrivastava, A., Dash, PK., Tripathi, NK., Sahni, AK., Gopalan, N. & Lakshmana R. PV.	Evaluation of a commercial Dengue NS1 enzyme-linked immunosorbent assay for early diagnosis of dengue infection.	Kaupallisen ELISA-kitin arviointi varhaisen dengue-infektion diagnostiikassa.	Shrivastava, A., Dash, PK., Tripathi, NK., Sahni, AK., Gopalan, N. & Lakshmana R. PV. 2011. Evaluation of a commercial Dengue NS1 enzyme-linked immunosorbent assay for early diagnosis of dengue infection. <i>Indian Journal of Medical Microbiology</i> . 2011 nro 29 (1), 51-55.
Mwapasa V., Cachafeiro, A., Makuta, Y., Beckstead, DJ., Pennel, ML., Chilima, B., Mwangomba, B.,	Using a simplified immunodeficiency virus type 1 p24 antigen assay to diagnose pediatric HIV-infection in Malawi.	Yksinkertaistetun ELISA-menetelmän käyttö mahdollisena välineenä lasten HIV-infektion diagnostiikkaan Malawissa.	Mwapasa V., Cachafeiro, A., Makuta, Y., Beckstead, DJ., Pennel, ML., Chilima, B., Mwangomba, B., Fiscus, SA. & Kwiek, JJ. 2010. Using a simplified immunodeficiency virus type 1 p24 antigen assay to diagnose pediatric HIV-infection in Malawi. <i>Journal of Clinical Virology</i> . 2010 nro 49 (4), 299-302.

Fiscus, SA. & Kwiek, JJ.			
Tuteja, U., Kumar, S., Shukla, J., Kingston, J. & Batra, HV.	Simultaneous direct detection or toxigenic and non-toxigenic <i>Vibrio cholerae</i> from rectal swabs and environmental samples by sandwich ELISA.	<i>Vibrio cholerae</i> – bakteerin toksisen ja ei-toksisen infektion samanaikainen havaitseminen sandwich-ELISA:lla.	Tuteja, U., Kumar, S., Shukla, J., Kingston, J. & Batra, HV. 2007. Simultaneous direct detection or toxigenic and non-toxigenic <i>Vibrio cholerae</i> from rectal swabs and environmental samples by sandwich ELISA. <i>Journal of Medical Microbiology</i> . 2007 nro 56 (10), 1340-1345.

## Science Direct, ELISA

Search results: 109 results found for pub-date > 2003 and TITLE-ABSTR-KEY(enzyme-linked immunosorbent assay) and TITLE-ABSTR-KEY(clinical diagnosis)[All Sources(Immunology and Microbiology)].

Haussa poistin kirjat hakuvaihtoehtoista ja aiheiden julkaisuväli on vuodesta 2004 nykypäivään eli kymmenen vuotta. Yhteensä hausta tuli 109 tulosta, otsikoiden lukemisen jälkeen valitsin aiheita eniten lähestyvät aiheet, joiden abstraktit luin. Abstraktien lukemisen ja julkaisuihin paremmin perehtymisen jälkeen valitsin neljä aiheita kirjallisuuskatsaukseeni.

Tekijät:	Nimi:	Kuvaus:	Lähde
Tanyuksel, M., Yilmaz, H., Ulunkanligil, M., Araz, E., Cicek, M., Koru, O., Tas, Z. & Petri, W. A.	Comparison of two methods (microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay) for the diagnosis of amebiasis.	Amebiaasin diagnosoinnin vertailu mikroskopoinnin ja ELISA:n välillä.	Tanyuksel, M., Yilmaz, H., Ulunkanligil, M., Araz, E., Cicek, M., Koru, O., Tas, Z. & Petri, W. A. 2005. Comparison of two methods (microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay) for the diagnosis of amebiasis. <i>Experimental parasitology</i> . 2005 nro 110 (3), 322-326.
Phunpae, P., Chanwong, S., Tayapiwatana, C., Apiratmateekul, N., Ma-keudom, A. & Kasinrek, W.	. Rapid diagnosis of tuberculosis by identification of Antigen 85 in mycobacterial culture system	Tuberculoosin diagnosointi viljelystä antigeeni 85:n avulla.	Phunpae, P., Chanwong, S., Tayapiwatana, C., Apiratmateekul, N., Ma-keudom, A. & Kasinrek, W. 2014. Rapid diagnosis of tuberculosis by identification of Antigen 85 in mycobacterial culture system. <i>Diagnostic Microbiology and Infectious Disease</i> . 2014 nro 78 (3), 242-248.
Mohapatra, J. K., Sanyal, A., Hemadri, D., Tosh, C., Palani, G., Rasool, T.	Development and comparison of genome detection assays for the	Suu- ja sorkkataudin tunnistamisen kehitys, mukana real time PCR	Mohapatra, J. K., Sanyal, A., Hemadri, D., Tosh, C., Palani, G., Rasool, T.

J. & Bandyopadhyay, S. K.	diagnosis of foot-and-mouth disease suspected clinical samples.	ELISA.	J. & Bandyopadhyay, S. K. 2006. Development and comparison of genome detection assays for the diagnosis of foot-and-mouth disease suspected clinical samples. <i>Journal of Virological Methods</i> . 2006 nro 137 (1), 14-20.
Araj, G. F.	Update on laboratory diagnosis of human brucellosis	Bruselloosin diagnoso- inti.	Araj, G. F. 2010 Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. <i>International Journal of Antimicrobial Agents</i> . 2010 nro 36, (1), S12-S17.

## LIITE 2: POSTERI

# Western blot- ja ELISA-menetelmät mikrobiologian laboratorioissa

Emmi Janatuinen

## JOHDANTO

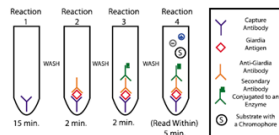
Western blot- ja ELISA-menetelmät perustuvat vasta-aineen ja antigeenin sitoutumiseen. Tämä kompleksi on elintärkeä osa ihmisen normaalia immuunipuolustusta torjuttaessa elimistölle vieraita aineita. Nykypäivän vasta-aineiden käyttö ja immunologiset testit ovat yleisiä klinisissä laboratorioissa ja vierianalytiikassa. Opinnäytetyöni aihe on Western blot- ja ELISA-menetelmät mikrobiologian laboratorioissa. Opinnäytetyöni tarkoitus on selvittää Western blot- ja ELISA-menetelmien käyttöä mikrobiologiassa. Opinnäytetyön tavoitteena on koota yhteen tutkimustietoa Western blot- ja ELISA-menetelmien käytöstä mikrobiologiassa. Western blot- ja ELISA-menetelmiä käytetään klinisen mikrobiologian laboratorioissa. Kliininen mikrobiologia tutki mikrobien aiheuttamia infektioita ja ihmisiä.

## TAUSTA

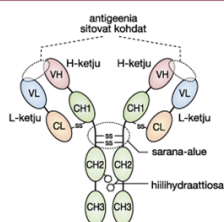
Opinnäytetyöni koostui kirjallisuuskatsauksesta, jonka avulla hankin tietoa Western blot- ja ELISA-menetelmien käytöstä mikrobiologiassa. Kirjallisuuskatsauksen avulla pyrin selvittämään kyseisten menetelmien käyttöä, ja opinnäytetyöni on luonut pohjaa mahdolliselle toiselle työlle, jossa tehtäisiin harjoitustyöhöje immunologian opetuskokonaisuuteen. Tein kirjallisuushaun kahdesta eri tietokannasta, Science Directistä ja Pubmedistä. Valitsin artikkelit lukemalla hakutulosten abstraktit. Hakutulosten perusteella valitsin Pubmedin Western blot –menetelmän hausta viisi artikkelia 24:stä hakutuloksesta ja Science Directin Western blot –menetelmän hausta kuusi artikkelia 69:stä hakutuloksesta. Pubmedin ELISA-menetelmän hausta valitsin kahdeksan artikkelia 90:stä hakutuloksesta ja Science Directin hausta valitsin neljä artikkelia 109:stä hakutuloksesta. Hakusanoina käytin termejä Western blot, ELISA, method, microbiology.

## WESTERN BLOT- MENETELMÄ

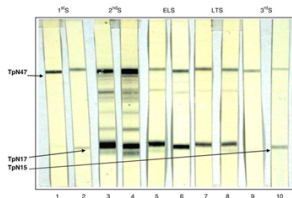
Western blot –menetelmää kutsutaan myös proteiinin blottaukseksi tai immunoblottaukseksi ja menetelmällä tutkitaan proteiineja. Western blot on menetelmä, jossa proteiineja erotellaan denaturoivalla geellelektroforeesilla. Elektroforeesin jälkeen ajonäytteet siirretään ja kiinnitetään filterille, johon lisätään antigeenille spesifistä vasta-ainetta. Vasta-aineiden spesifinen kiinnittyminen voidaan havaita visuaalisesti käyttämällä esimerkiksi kemiluminesenssileimaa. Menetelmää käytetään useiden infektiotautien taudin diagnostiikkaan, etenkin HIV-infektion varmistamiseen. Elektroforeesi perustuu sähkövirtaan, jonka avulla voidaan erottaa toisistaan yhdisteitä. Positiivisesti varautuneet yhdisteet liikkuvat negatiivisesti varautuneelle elektrodille eli katodille ja negatiivisesti varautuneet yhdisteet anodille eli positiivisesti varautuneelle elektrodille.



KUVA 1. (Koivunen & Krogsrud 2006, 493.) Kuvassa giardiaasi-infektion tunnistamiseen kehitetty sandwich-ELISA –menetelmä (GiardEIA). Tämä on yksi yleisimmistä ELISA-menetelmistä, niin kutsuttu sandwich-ELISA tai kaksoisvasta-ainetekniikkaan perustuva ELISA, jolloin tunnettu vasta-aine on kiinnitetty kiinteään alustaan, esimerkiksi kuoppalevyyn. Vasta-aineeseen tai antigeeniin on liitetty entsyymeilleima, joka substraatin kanssa reagoidessaan tuottaa mitattavan reaktiotuotteen.



KUVA 2. ( Jokiranta & Seppälä 2011, 104.) Kuvassa IgG-luokan vasta-aine. Vasta-aineet ovat immunoglobuliiniluokkia, jotka jakavat yhtenevän rakenteellisen muodon ja toiminnalliset periaatteet. Immunoglobuliinit (Ig) vastaavat vasta-ainevälitteisestä immunitetistä ja ne jaotellaan eri luokkiin ja niiden alaluokkiin. Immunoglobuliiniluokat ovat IgG, IgA, IgM, IgD ja IgE.



KUVA 3. (Antunes de Lemos, Belém, Santos & Ferreira 2007.) Kuvassa *Treponema pallidum* –bakteerin aiheuttaman syfilis-infektion taudin eri kliiniset vaiheet Western blot –menetelmällä: 1<sup>st</sup>: Primaari syfilis, 2<sup>nd</sup>: sekundäärinen syfilis, ELS: aikaisen vaiheen latentti syfilis, LTS: myöhäisen vaiheen latenssi syfilis, 3<sup>rd</sup>: tertiäärinen syfilis.

## ELISA-MENETELMÄ

ELISA eli enzyme-linked immunosorbent assay tulee ilmi monesti, kun puhutaan EIA:sta eli enzyme immunoassay –menetelmästä. EIA kuvaa yleisesti immunologista analyysia (Immunoassay), jossa käytetään entsyymeilleimaa. ELISA-menetelmää käytetään myös puhuttaessa entsyymeilleimaisista analyyseistä, mutta useimmiten ELISA:an viitataan, kun vasta-aine tai antigeeni on kiinnitetty kiinteään pintaan (solid phase). ELISA on immunologinen menetelmä, jossa kiinteään pintaan kiinnitettyihin vasta-aineisiin sitoutuu antigeenejä spesifisesti. Antigeenin sitoutumisen jälkeen testiin voidaan lisätä vasta-aine, johon on leimattu entsyymi. Leimattu vasta-aine kiinnittyy spesifisesti antigeeniin. Kun testiin lisätään substraatti, se reagoi entsyymien kanssa tuottaen mitattavan reaktion.

## KIRJALLISUUSKATSAUKSEN TULOKSET

ELISA-menetelmän avulla infektio voidaan tunnistaa potilasnäytteestä yleensä suhteellisen nopeasti verrattaessa esimerkiksi virusten tunnistamisessa paljon käytettyä virusisolaatiota, jonka tulokseen voi kulua pitkä aika. ELISA-menetelmällä on etuja, että siitä kytetään tekemään yksinkertaisia, kustannusvaikuttavia ja nopeita menetelmiä, minkä vuoksi sen käyttökelpoisuus on suuri myös alueilla, joissa ei ole varaa ylläpitää kallia laboratorioita ja osaavaa henkilökuntaa.

Western blot –menetelmä on tärkeä osa laboratorioanalytiikassa ja tutkimustyössä sen korkean spesifisyyden ja sensitiivisyyden vuoksi. Sitä käytetään diagnostisena menetelmänä ja useiden infektioiden diagnostiikassa varmistusmenetelmänä, jolla varmistetaan infektio yhden tai useamman seulonakokeen jälkeen

## POHDINTA

ELISA-menetelmiä kehitetään koko ajan ja niiden merkitys tulee kasvamaan tulevaisuudessa. ELISA-menetelmillä voidaan saavuttaa tuloksia nopeasti, sillä menetelmä ei vaadi paljon aikaa ja se on suhteellisen yksinkertainen käyttää. ELISA-menetelmien kehittäminen vieraimeenilmiksi ja mukaan kentytyöhön otettaviksi lisää niiden arvoa myös alueilla, joissa on hankalaa suorittaa laboratorioanalytiikkaa ja mittauksia.

Western blot –menetelmän vahvuuksia on sen kyky spesifisyyteen ja sensitiivisyyteen eri tutkimusten analytiikassa. Menetelmä on kallis ja vaatii koulutettua henkilökuntaa. Immunologisten menetelmien kehittäessä Western blot –menetelmä saattaa siirtyä taka-alalle mikrobiologian laboratorion diagnostiikassa, mutta menetelmä on edelleen tehokas ja tärkeä osa tutkimustyötä ja laboratorioanalytiikkaa.